

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE TOXIZITÄT, PYROGENITÄT
UND ANTIGENITÄT EINES MIT HYDROXYLAMIN
BEHANDELTEN BAKTERIELLEN LIPOPOLYSACCHARIDES

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Heidrun Klingebiel

aus Berlin

1973

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr.med.Bernhard Schmidt

Untersuchungen über die Toxizität, Pyrogenität
und Antigenität eines mit Hydroxylamin
behandelten bakteriellen Lipopolysaccharides

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heidrun Klingebiel
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Klaus Großgebauer

Korreferent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Promoviert am 18. Oktober 1973



Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung.....	7
I.	Biologische Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide.....	8
1.	Toxizität.....	8
2.	Pyrogenität.....	9
3.	Antigenität.....	11
II.	Zusammenhänge zwischen biologischen Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide und deren molekularem Aufbau.....	16
III.	Zur Herstellung von bakteriellen Endotoxoiden.....	18
IV.	Fragestellung der Arbeit.....	20
B.	Experimenteller Teil.....	21
I.	Material und Methoden.....	22
1.	Bakterielles Lipopolysaccharid und die Herstellung eines Endotoxoids.....	22
a)	Endotoxin-Ansätze.....	22
b)	Hydroxylamin-Lösung.....	23
c)	Endotoxin-Hydroxylamin-Gemische.....	23
2.	Durchführung der i.v.-Injektionstechnik am Brutei.....	25
3.	Durchführung der Kaninchenpyrogentest.....	26
4.	Bestimmung von Endotoxin-Antikörpern im passiven Haemagglutinationstest.....	28

II.	Ergebnisse.....	30
1.	Die Bestimmung der LD ₅₀ des bakteriellen Lipopolysaccharides und des entsprechenden Endotoxoids im Brutei.....	30
2.	Die Toxizität des nativen und des mit NH ₂ OH vorbehandelten Endotoxins für das Brutei.....	33
3.	Der Einfluß von humoralen Endotoxin-Antikörpern auf die eitoxische Wirkung von nativem und mit NH ₂ OH vorbehandeltem Endotoxin.....	35
4.	Die Wirkung von nativem bzw. mit NH ₂ OH vorbehandeltem LPS im Kaninchenpyrogentest.....	37
5.	Vergleich zwischen bakteriellem Endotoxin und Endotoxoid bezüglich ihrer Fiebertoleranz-induzierenden Wirkung.....	42
6.	Die Fiebertoleranzentwicklung nach mehrmaligen Gaben von Endotoxoid.....	47
7.	Nachweis der antigenen Wirkung von bakteriellem Endotoxin bzw. Endotoxoid im passiven Haemagglutinationstest.....	51
	a) Homologer Antikörpertiter nach Endotoxin- und Endotoxoideinzelgabe.....	51
	b) Homologer Antikörpertiter nach mehrmaligen Gaben von Endotoxin bzw. Endotoxoid.....	53
	c) Heterologer Antikörpertiter nach mehrmaligen Endotoxin- bzw. Endotoxoidgaben.....	55
8.	Der Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf den Antikörpertiter von Endotoxin- und Endotoxoid-Antiseren.....	57

9. Die Prüfung der Bindungsfähigkeit von erhitztem und unerhitztem Endotoxin bzw. Endotoxoid an Hammelerythrozyten.....	59
10. Die Auslösung des Schwartzman-Phänomens....	61

C. Diskussion.....	63
D. Zusammenfassung.....	73
E. Schrifttumverzeichnis.....	78



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550802_0028

A. EINLEITUNG

I. Biologische Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide

Bakterielle Endotoxine sind komplex aufgebaute Lipopolysaccharide aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Sie üben auf den menschlichen und tierischen Organismus die unterschiedlichsten Wirkungen aus (s. Abb. 1).

In heutiger Sicht resultiert nach Endotoxineinwirkung auf einen Makroorganismus ein systemischer Effekt. Ganz verschiedene Reaktionen laufen nebeneinander ab und sind die Ursache für so mannigfaltige Erscheinungen wie z.B. Fieber (Atkins 1960, Eichenberger 1966), primäre und sekundäre toxische Einflüsse auf den Gesamtorganismus, Degranulierung der polymorphkernigen Leukozyten, Freisetzung von lysosomalen Enzymen (Cline et al. 1968), Bildung von Interferon und Interferon-ähnlichen Stoffen (Stinebring und Younger 1964) und Stimulierung des Reticuloendothelialen Systems (Biozzi et al. 1955, Greisman et al. 1963 und Greisman et al. 1964).

Vom bakteriellen Lipopolysaccharid abzugrenzen ist das sog. Anaphylatoxin, das u.a. auch durch Endotoxin im Plasma freigesetzt werden kann (Hahn und Lange 1956, Netzer und Vogt 1964).

Im folgenden sollen die toxischen, pyrogenen und antigenen Eigenschaften gereinigter Lipopolysaccharide ausführlicher beschrieben werden, da sie Gegenstand dieser Studie sind.

1. Toxizität

Im allgemeinen unterscheidet man primäre und sekundäre toxische Lipopolysaccharid-(LPS-)Wirkungen (Watson und Kim 1963, Neter 1969, Chedid und Parant 1971). Unter der primär toxischen Wirkung können die Erscheinungen der Cytolyse (Heiman 1965), des Antitumoreffektes (Mizuno et al. 1968) und der Freisetzung von lysosomalen und anderen Enzymen (Cline et al. 1968) verstanden werden. Demgegenüber gehören zu den sekundären toxischen Wirkungen Phänomene wie Schock und Tod (Lasch 1967, Nagler und Levenson 1971), Hautreaktion, lokales und generali-

siertes Schwartzman-Phänomen (Lee und Stetson 1965).

Die Bedeutung der bakteriellen Endotoxine als pathogenetischen Prinzips liegt darin, daß sich Endotoxin-haltige Bakterien im empfänglichen Organismus vermehren und durch Zerfall diese Strukturen freisetzen. Das führt, z.B. im Rahmen einer Endotoxinämie, zu vielen systemischen Effekten wie Fieber, Mikrozirkulationsstörungen, Alterationen des haemostatischen Systems und schließlich zu Todesfällen.

(Über die Schwierigkeiten, z.B. durch prophylaktische Impfungen Ausbreitung und Wirksamwerden bakterieller Endotoxine zu verhüten s. A.III).

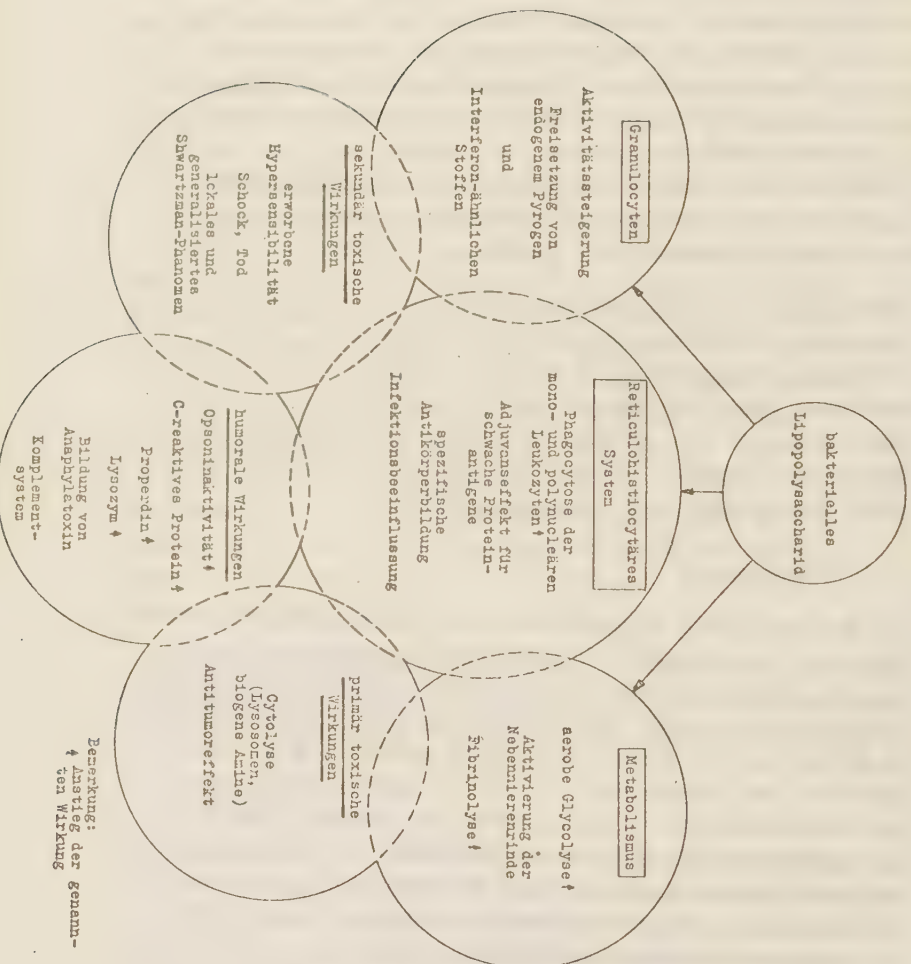
Zum Nachweis von bakteriellen Endotoxinen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (s. Tab. 1). Wegen der hohen Empfindlichkeit und der Tatsache, daß Hühnerembryonen immunologisch weitgehend inert sind, hat sich neuerdings der i.v.-Eitest zum Nachweis von Lipopolysacchariden bewährt (Kétyi 1963, Milner und Finkelstein 1966, Großgebauer und Langmaack 1967).

2. Pyrogenität

Die Erkennung und Eliminierung von kontaminierten Arzneimitteln, insbesondere mit pyrogenen bakteriellen Endotoxinen, ist ein altes Problem. Zur Zeit werden nach dem Deutschen Arzneibuch (DAB 7 1968) Infusionslösungen über 10 ml im sog. Kaninchenpyrogentest geprüft. Es wird dabei zunächst drei Kaninchen $1/10$ der therapeutischen Dosis des Medikamentes i.v. appliziert. Die Temperaturmessung erfolgt rektal. Überschreitet die Summe der Quadrate der maximalen Temperaturerhöhungen den Wert 0,6, wird der Versuch auf fünf weitere Tiere ausgedehnt. Überschreitet die Summe der Quadrate hierbei den Wert 1,6, ist das Mittel als pyrogenhaltig anzusehen. (Zur Problematik des Pyrogennachweises s. Großgebauer 1967)

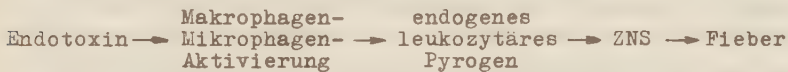
Es hat nicht an Versuchen gefehlt, den relativ aufwendigen Kaninchenpyrogentest durch andere Verfahren zu

Abb. 1 : Allgemeine Übersicht über biologische Wirkungen bakterieller Lipopolysaccharide



ersetzen (s. Tab. 1). Bisher hat sich jedoch noch keine andere Methode des Pyrogennachweises in der Praxis bewährt.

Beim Studium der Pathogenese des Endotoxin-Fiebers ergeben sich verschiedene bemerkenswerte Befunde (s. Abb. 2). Nach intravenöser Zufuhr des exogenen Pyrogens (= Endotoxin) entsteht dosisabhängig nach einer kurzen Latenzzeit von etwa 20 Minuten ein doppelgipfliges Fieber. Den heutigen Vorstellungen entsprechend soll das Fieber durch einen körpereigenen, leukozytären Stoff, das sog. endogene Pyrogen, zentral im Hypothalamus ausgelöst werden (Wood 1958, Gillman et al. 1961, Herion et al. 1961, Atkins und Heijn 1965, Snell und Atkins 1967, Feldberg und Saxena 1970) :



Das Zustandekommen der beiden Fiebergipfel, denen wahrscheinlich unterschiedliche Entstehungsmechanismen zugrunde liegen (Greisman und Woodward 1970), und die nach mehrmaliger Zufuhr von Endotoxin auftretende Abflachung des zweiten Gipfels (Greisman et al. 1969) sind noch ungeklärte Phänomene. Die sich entwickelnde "inkomplette Fiebertoleranz" ist begleitet von einem Anstieg spezifischer Serum-Antikörper der Gruppe 19 S (Kim und Watson 1965, Mulholland 1965, Greisman et al. 1969).

(Übersichten zum Endotoxin-Fieber siehe bei Atkins 1960, Eichenberger 1966, Atkins und Snell 1965, Snell 1971)

3. Antigenität

Unter dem Kapitel "Pyrogenität" wurde bereits erwähnt, daß bakterielles Endotoxin antigen ist und die Bildung spezifischer Antikörper der Gruppen 19 S und teilweise auch 7 S stimuliert. Der Nachweis dieser Antikörper

geschieht üblicherweise im passiven Haemagglutinationstest (Neter 1956).

Die antigenen Eigenschaften der Bakterien sind an der Oberfläche, im Polysaccharidanteil des LPS lokalisiert (somatische oder O-Antigene, allgemeines oder "common" Antigen). Die spezifischen Anti-Endotoxine wirken nicht infektionsneutralisierend; auch ist nicht zwangsläufig eine Toleranz mit ihnen korreliert (Wolff et al. 1964, Michael 1966).

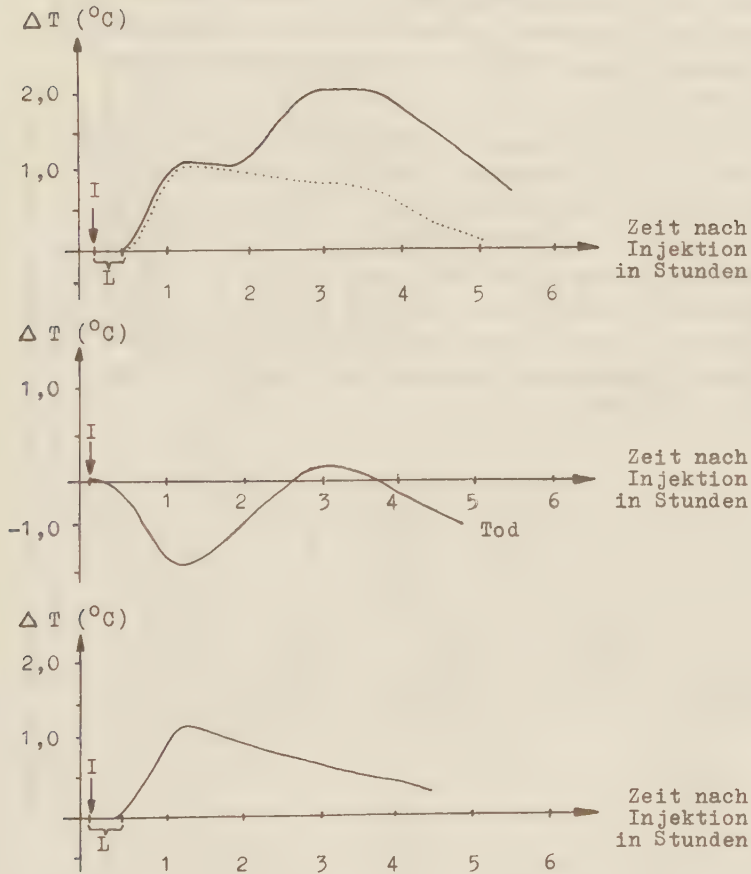
Hohe Lipid-A-Antikörpertiter können durch Immunisierung mit Säure-behandelten Bakterienzellen erhalten werden, die mit Lipid A sensibilisiert worden sind. Die Anti-Lipid-A-Aktivität der Immunseren kann mit Hilfe der passiven Haemolyse von Lipid-A-sensibilisierten Erythrozyten in Gegenwart von Komplement nachgewiesen werden (Galanos et al. 1971). Die Lipid-A-Antikörper sind in der IgM- und IgG-Fraktion zu finden. Ein anderes Verfahren, Lipid-A-Antikörper nachzuweisen, besteht darin, sog. Liposome mit Lipid A bzw. Lipopolysacchariden zu sensibilisieren (Kataoka et al. 1971).

Die von verschiedenen Autoren postulierte "Desensibilisierung" im Rahmen der Toleranzentwicklung (Watson und Kim 1963, Greisman und Woodward 1965) wird von Snell (1971) mit dem Argument abgelehnt, daß eine erworbene Endotoxin-Hyperreaktivität weder auf humoraler noch auf zellulärer Basis bis jetzt nachgewiesen werden konnte.

Lediglich für das Schwartzman-Phänomen liegen Ergebnisse vor, die eine Beziehung zu hyperergen Reaktionen wahrscheinlich werden lassen (Lee und Stetson 1960, Neter 1969, Snell 1971). Dafür soll der Peptidanteil des Lipopolysaccharides eine ursächliche Bedeutung haben.

Aus der Tatsache, daß auf einen Endotoxinreiz hin spezifische Antikörper gebildet werden und ein geringer Infektionsschutz entsteht, wurde die Vorstellung einer Immunisierung von Tieren und Menschen mit Endotoxinen bzw. Endotoxinbildnern zum Schutze gegen derartige

Abb. 2 : Schematische Darstellung der Fieberantworten
beim Kaninchen nach intravenöser Applikation
von Endotoxin



- Bemerkungen: A. Fieber nach i.v. Applikation kleiner (a) und mittlerer Dosen (b) Endotoxin (unvorbehandelte Tiere)
- B. Hypothermie nach i.v. Applikation sehr hoher Dosen Endotoxin (unvorbehandelte Tiere)
- C. Fieber nach i.v. Applikation von Endotoxin (tolerante Tiere)

L = Latenzzeit, I = Injektion, ΔT = Temperaturdifferenz bezogen auf die Ausgangsrektaltemperatur

Infektionen entwickelt. Die Untersuchungen von Besredka (1926) über die orale Immunisierung sind in den letzten Jahren von Raettig und Mitarbeitern (Raettig 1964 und Raettig 1965) in Modellversuchen an der Maus weiter verfolgt worden. Insgesamt ergeben sich aus diesen Versuchen ermutigende Hinweise über die Brauchbarkeit derartiger Impfstoffe.

Die biologische Wirksamkeit gramnegativer, bakterieller Vakzinen ist bei intravenöser Applikation gering. Über die Gründe für die Ineffektivität ist wenig bekannt. Neuerdings wird von Wardlaw (1972) eine "diversionary antigen"-Hypothese aufgestellt, nach der die O-Antigene den Immunapparat des Wirtes auf die Bildung von nicht protektiven, humoralen Antikörpern "ablenken", so daß sich unter anderem auch keine nennenswerte zelluläre Immunität entwickeln kann.

Tab. 1 : Verfahren zum Nachweis der toxischen, pyrogenen und antigenen Wirkung von bakteriellen Endotoxinen

	Nachweisverfahren	Bemerkungen
Toxizität	i.v.-Bruteitest am 9 bis 11 Tage alten Hühnerembryo (Kstyl 1964, Milner u. Finkelstein 1966, Großgebauer u. Lengmaack 1967)	LD ₅₀
Pyrogenität	Kaninchenpyrogentest (DAB 7 1968) (andere Tiere haben sich nicht bewährt)	hohe Empfindlichkeit gegen- über Endotoxin (ca. 2,5ng/kg) Fieberindex Temperaturdifferenz 3 Stunden nach Injektion
Antigenität	Nachweis von Anti-Endotoxinen: passiver Haemagglutinationstest (Neter 1956) bakterizide Eigenschaften (Michael u. Braun 1959) bakterielle Agglutination (Mulholland 1965, Haugen 1971) Immunhaemolyse (mit Komplement) (Haugen 1971) Bentonit-test (Antikörper-Präzipitationstest) (Bozicevich et al. 1960, Wolff et al. 1965)	Immunisierung von Tieren vor allem Kaninchen Ratten Mäuse .
allgemeiner Endotoxin-Nachweis	sog. Limulus-Test (Cooper et al. 1971) . . Mäusetest (Baker u. Wilson 1965) Immunoelektrophorese (Skarnes 1966) Gewebekultur (Heilman 1968)	Hypoferrämie nach 12 Stunden Makrophagenwanderung

II. Zusammenhänge zwischen biologischen Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide und ihrem molekularen Aufbau

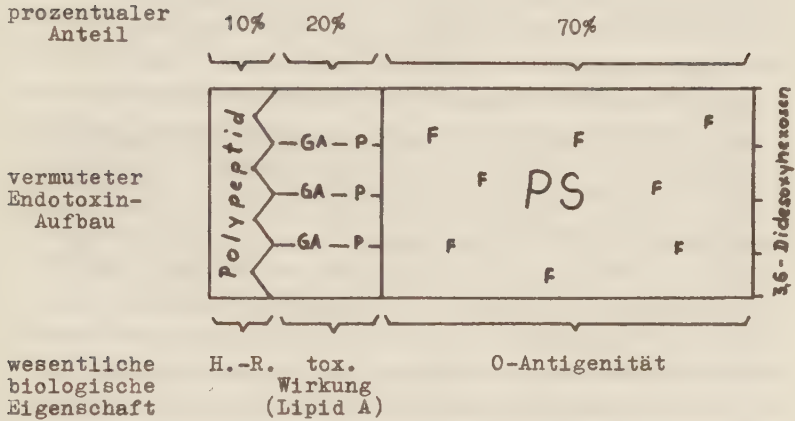
Die Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität bakterieller Endotoxine sind seit langem Gegenstand intensiver Studien (Übersichten bei Ribí et al. 1961, Nowotny 1969, Nowotny 1971). Dennoch ist die exakte Zuordnung einer bestimmten biologischen Eigenschaft zu einer definierten LPS-Struktur problematisch (s. Abb. 3).

Am sichersten ist die Annahme, daß die O-Antigenität des Lipopolysaccharides auf seinem Polysaccharidanteil basiert. Möglicherweise liegt im Peptidanteil die Aktivität, die für die Auslösung der Hautreaktion verantwortlich ist. Das sog. Lipid A soll der Träger der toxischen Eigenschaften sein (Westphal und Lüderitz 1954, Westphal et al. 1958, Rietschel et al. 1971). Die verminderte biologische Wirkung des Lipid A im Vergleich zum Gesamtmolekül wird von ihnen auf die geringere Löslichkeit dieser Fraktion zurückgeführt. Zur vollständigen Wirksamkeit gehört ihrer Auffassung nach der Polysaccharidanteil als Lösungsvermittler.

Demgegenüber führt Nowotny (1971) an, daß es nach Säurehydrolyse, die von Westphal und Lüderitz (1954) zur Präparation angewendet wird, nur zu einer groben Trennung in wasserlösliche und wasserunlösliche Komponenten kommt. Zudem läßt sich das sog. Lipid A noch in wenigstens 16 verschiedene Einzelfractionen aufteilen, die größtenteils noch toxische Aktivitäten besitzen.

Unterstützt wird diese Annahme auch durch Arbeiten von Ribí et al. (Ribí et al. 1961, Haskins et al. 1961), die ein fast lipidfreies Endotoxin mit großer biologischer Wirksamkeit herstellten.

Abb. 3 : Hypothetischer Aufbau und vermutete Aktivitäten
bakteriellen Endotoxins
(nach Nowotny 1971)



Bemerkungen: GA = D-Glucosamin
P = Phosphatgruppen
F = Fettsäuren
PS = Polysaccharid
H.-R. = Hautreaktion

III. Zur Herstellung von bakteriellen Endotoxoiden mit chemischen Mitteln

Zur Abwehr und Überwindung bakterieller Infektionen kommt neben den Antibiotika den aktiven Impfstoffen eine entscheidende Rolle zu. Die Vakzinen gegen die grampositiven Ektotoxinbildner (Tetanus, Diphtherie) erfüllen die Voraussetzungen der guten Verträglichkeit bei ausreichender Produktion von schützenden, toxin-neutralisierenden Antikörpern zu voller Zufriedenheit.

Entsprechend wirkungsvolle Impfstoffe zur Verhütung und Überwindung von Infektionen durch gramnegative "Problemkeime" (E.coli, Proteus vulgaris, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus u.a.) fehlen zur Zeit im Handel. Die kommerziellen Impfstoffe "Staphar" und "Euflamin" der Behringwerke AG (Behringcodex 1971) sollen zur Behandlung von Staphylodermien bzw. zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen eingesetzt werden. Sie stellen jedoch keine eigentlichen Endotoxoiden dar. Es besteht darum nach wie vor praktisches Interesse daran, Endotoxoiden herzustellen, die Risikopatienten vor (atopischen) Infektionen schützen.

Während es sich bei den Anti-Ektotoxinen vornehmlich um protektive, d.h. toxinneutralisierende γ -S-Antikörper handelt, kommt es nach Endotoxin-Applikation im wesentlichen zur Bildung von $19S$ - Immunglobulinen, die als potente Opsonine aufgefaßt werden, die RHS-Phagocytose fördern, jedoch keine direkten, toxinneutralisierenden Wirkungen besitzen.

Um die entscheidende künstliche Dissoziation von Toxizität und Antigenität zu erreichen, wurden die Endotoxine den unterschiedlichsten Verfahren unterworfen (Übersichten s. bei Sultzner 1971, Nowotny 1969).

Erste Versuche wurden an ganzen Zellen mit Formalin unternommen.

Boivin führte zur Detoxifizierung die saure Hydrolyse

ein, die zu einer groben Aufspaltung des Makromoleküls und einer Trennung in eine toxische, wasserunlösliche und eine biologisch inaktive, wasserlösliche Phase führt.

Nach alkalischer Hydrolyse kommt es zu einer Reduktion der Partikelgröße, vor allem aber zu sterischen Veränderungen innerhalb des Moleküls, die mit einem Verlust der toxischen Aktivität verbunden sind. Die Antigenität bleibt hierbei zum Teil erhalten.

Versuche, das Lipopolysaccharidmolekül durch Detergentien (Natriumlaurylsulfat, Natriumdesoxycholat) in Untereinheiten aufzuspalten, führten zu einem Verlust jeglicher biologischen Potenz. Nach Entfernung des Detergens kommt es jedoch zu einer Rekonstitution des Endotoxinmoleküls.

Durch Beeinflussung vor allem der langkettigen Fettsäuren läßt sich deren Bedeutung für viele biologische Wirkungen nachweisen (z.B. Transesterifikation mit Bortrifluorid, O-Acyl-Spaltung mit Kaliummetholat, Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und Dissoziation mit einem äquimolaren Gemisch aus Ameisensäure und Pyridin). Auch Lithiumaluminiumhydrid und Hydroxylamin führen zu einer Reduktion des Gehaltes an langkettigen Carboxylsäuren; die so gewonnenen Präparationen zeigen eine verminderte Toxizität und Pyrogenität, während die Antigenität, die Fiebertoleranzentwicklung und die Entstehung eines Infektionsschutzes in geringerem Maße alteriert sind.

Diese Versuche zeigen, daß zwar eine Zerstörung toxischer Aktivitäten des Endotoxin-Makromoleküls auf chemischem Wege möglich ist, daß jedoch die Herstellung wirkungsvoller und dem Menschen verträglicher antigener Endotoxide nach wie vor problematisch ist.

IV. Fragestellung dieser Arbeit

Wie unter A.III ausgeführt wird, ist das Problem der Herstellung von entgifteten und stark antigenen bakteriellen Endotoxinen zur Zeit noch nicht optimal gelöst. Da die Entwicklung von derartigen "Endotoxoiden" mit dem Ziele der Resistenzerhöhung vor allem gegenüber gramnegativen Keimen noch immer von großem praktischen Interesse ist, soll in dieser Arbeit der Einfluß von alkalischem Hydroxylamin auf biologische Eigenschaften eines bakteriellen Endotoxins (E.coli O 26 : B 6) geprüft werden. Um eine Aussage über eine eventuelle Brauchbarkeit von Hydroxylamin zur Endotoxin-Entgiftung machen zu können, werden die toxischen, pyrogenen, Fiebertoleranz-induzierenden und antigenen Eigenschaften von mit Hydroxylamin behandeltem und nativem Endotoxin vergleichend untersucht.

B. EXPERIMENTELLER

TEIL

I. Material und Methoden

1. Bakterielles Lipopolysaccharid und die Herstellung eines Endotoxoids

Zu den folgenden Versuchen wird kommerzielles Endotoxin der Difco Laboratories Michigan / USA verwendet. Die Versuche werden mit LPS B E.coli 0 26 : B 6 (Control 558 188 und 560 145) durchgeführt. Im passiven Haemagglutinationstest wird bei der Prüfung auf heterologe Antikörper nach E.coli-Endotoxin-Gabe in einem Versuch LPS B S.typhosa (Control 518 008) derselben Firma herangezogen.

a) Endotoxin-Ansätze

Zur Bereitung der Endotoxin-Ansätze werden Carbonat-Hydrogencarbonat-Pufferlösungen vom pH 9,6 bzw. pH 10,7 hergestellt:

verwendete Chemikalien:

Natriumcarbonat	- Na_2CO_3 , wasserfrei pro analysi E.Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	- NaHCO_3 , pro analysi E.Merck, Darmstadt
sterilisiertes, pyrogenfreies, neutrales Wasser als Lösungsmittel	

als Stammlösungen werden angesetzt

Stammlösung I = 2,12 g Na_2CO_3 / 100 ml

Stammlösung II = 1,68 g NaHCO_3 / 100 ml

folgende Pufferlösungen werden daraus hergestellt:

Pufferlösung pH 9,6 = 8 ml Stammlösung I
17 ml Stammlösung II
aufgefüllt auf 100 ml

Pufferlösung pH 10,7 = 21,3 ml Stammlösung I
3,8 ml Stammlösung II
aufgefüllt auf 100 ml

Es werden jeweils 0,01 g Endotoxin abgewogen und in 100 ml Puffer gelöst. Es ergibt sich eine Konzentration von 0,1 mg Endotoxin / 1 ml .

b) Hydroxylamin-Lösung

Zur Herstellung einer neutralen Hydroxylamin-Lösung werden verwendet:

Hydroxylamin	- NH_2OH , Hydroxylaminchlorid sulfatfrei, puriss., Fluka AG Buchs SG
Natriumhydroxid	- NaOH, Plättchenform, reinst pro analysi E. Merck, Darmstadt

Es werden gleiche Mengen einer 4-molaren NH_2OH -Lösung und einer 14%igen NaOH-Lösung zusammengegeben. Es resultiert eine 2-molare NH_2OH -Lösung mit neutralem pH-Wert.

Zur Ermittlung der LD_{50} des detoxifizierten Endotoxins verwenden wir eine 4-molare NH_2OH -Lösung, die mit entsprechend höher konzentrierten Lösungen in gleicher Weise hergestellt wird.

c) Endotoxin-Hydroxylamin-Gemische:

Die Endotoxin-Pufferlösungen (pH 9,6 bzw. pH 10,7 ; Herstellung s.o.) werden auf eine Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ verdünnt und folgendermaßen weiter verarbeitet:

Endotoxin-Pufferlösung pH 10,7 = Zugabe der 2-molaren Hydroxylamin-Lösung im Verhältnis 1:1; es resultiert eine 1-molare Hydroxylamin-Lösung vom pH 8,6. Endotoxin-Endkonzentration: $10 \mu\text{g/ml}$

Endotoxin-Pufferlösung pH 9,6 = Diesem Kontroll-Ansatz wird, ebenfalls im Verhältnis 1:1, nochmals Pufferlösung vom pH 9,6 zugesetzt. Endotoxin-Endkonzentration: $10 \mu\text{g/ml}$

Zur Herstellung der bei der Ermittlung der LD_{50} für natives und vorbehandeltes Endotoxin notwendigen Konzentrationen von $50 \mu\text{g/ml}$ bzw. $100 \mu\text{g/ml}$ werden die Endotoxin-Konzentrationen der Pufferlösungen entsprechend erhöht. Konzentrationen unter $10 \mu\text{g/ml}$ werden durch nachträgliche Verdünnung mit sterilisierter, pyrogenfreier, isotonischer Kochsalzlösung (Physiologische Kochsalzlösung, Infusionslösung zur parenteralen Anwendung, Dr.E.Fresenius KG, Bad Homburg) bereitet.

Die so hergestellten Ansätze werden ein bis fünf Tage bei 20°C inkubiert. Anschließend werden sie 24 Stunden lang gegen eine phosphatgepufferte, isotonische Kochsalzlösung (pH 7,3) dialysiert.

Nach Herstellung des Endotoxin-Hydroxylamin-Gemisches und des Endotoxin-Kontrollansatzes, sowie vor der Dialyse werden die pH-Werte mittels eines elektrischen pH-Meters gemessen. Es wird darauf geachtet, daß die pH-Werte nie mehr als 0,2 Einheiten von den errechneten Werten abweichen.

2. Durchführung der i.v.-Injektionstechnik

Für die Toxizitätsprüfungen werden Eier weißer Leghornhühner benutzt, die 11 Tage lang in einem Inkubator (automatische Temperaturregelung: $37,5 \pm 0,5$ °C) bebrütet worden sind. Mittels eines Durchleuchtungsapparates wird eine Vene auf der Schale markiert. An dieser Stelle wird die Schale entfernt und ein Tropfen Immersionsöl (E.Merck, Darmstadt) auf die Kalkhaut getropft. Dadurch stellt sich die Vene deutlich dar, gleichzeitig wird die Kalkhaut gefestigt. Das Untersuchungsmaterial wird mit einer 1ml Constanta-Spritze und einer feinen, hierfür angefertigten Nadel intravenös injiziert. Die Nadel bleibt während der 24-stündigen Nachbebrütungszeit im Gefäß liegen, um die sonst auftretenden Blutungen aus der Einstichstelle zu verhindern (Großgebauer et al. 1967).

Gewertet werden nach 24 Stunden diejenigen Embryonen, die leben (kein Toxinnachweis) oder typische, toxisch bedingte haemorrhagisch Veränderungen zeigen.

Pro Ei werden jeweils 0,1 ml Flüssigkeitsvolumen intravenös injiziert.

Gesamteierverbrauch: 1540

3. Durchführung der Kaninchenpyrogentests

Es werden Kaninchen beiderlei Geschlechts verwendet, die zwischen 1,5 und 2 kg wiegen. Die Temperaturregistrierung erfolgt mittels des Thermoelektrischen Apparates der Fa. Hartmann und Braun, Frankfurt/Main. Die Temperaturfühler werden den Tieren ca. 5 - 7 cm in das Rektum eingeführt und während des gesamten Versuches dort belassen. Vor Injektion des Versuchsmaterials wird den Tieren über 2 Stunden die Normaltemperatur gemessen.

Das Versuchsmaterial wird dann jeweils in 10 ml physiologischer, pyrogenfreier Kochsalzlösung (Physiologische Kochsalzlösung, Infusionslösung zur parenteralen Anwendung, Dr.E.Fresenius KG, Bad Homburg) in eine Ohrtrandvene injiziert.

Es werden den Tieren jeweils $1 \mu\text{g}$ Endotoxoid bzw. $1 \mu\text{g}$ Endotoxin appliziert. Diese Dosis wird in Anlehnung an Watson und Kim (1963) gewählt, die in ihren Versuchen jeweils eine 100 MPD-3/kg benutzten. Der Wert kennzeichnet die 100fache Menge einer minimalen pyrogenen Dosis, die eine Temperaturerhöhung von ca. $0,5^\circ\text{C}$ nach 3 Stunden bewirkt. Für ein E.coli-Endotoxin wird von ihnen eine 100 MPD-3/kg von ca. $0,8 \text{ g}$ angegeben.

Die Temperaturregistrierung erfolgt bei Versuchen mit Endotoxin mindestens über $4 \frac{1}{2}$ Stunden, bei Versuchen mit Endotoxoid mindestens über 3 Stunden. Die Temperatursteigerung wird als Temperaturdifferenz bezogen auf die Ausgangsrektaltemperatur, d.h. die Normaltemperatur vor der Injektion des Versuchsmaterials angegeben.

Temperaturerhöhung nach 3 Stunden: Watson und Kim (1963) bzw. Greisman et al. (1969) sehen diesen Wert als typische Charakteristik von Temperaturverläufen nach Endotoxin-Gaben an, da Veränderungen der Temperaturantwort meist in die späte Phase der Fieberreaktion fallen.

Fieberindex: Der Fieberindex wird durch Ausmessung der Fläche unter der Temperaturkurve ermittelt. Dabei ent-

spricht eine Temperaturerhöhung von 0,5 °C über eine Stunde einem Fieberindex von 100 (Greisman et al. 1963).

Vorbereitung der Tiere für die Toleranzversuche: Den Kaninchen werden an 6 bis 8 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 µg Endotoxin bzw. Endotoxoid injiziert. Nach einem freien Intervall von weiteren 8 Tagen erfolgt dann der Toleranzversuch mit einer Dosis von 1 µg Endotoxin bzw. Endotoxoid pro Tier gleichfalls intravenös.

Die Endotoxin- und Endotoxoid-Ansätze werden vor dem Versuch im Bruteitest auf ihre Toxizität geprüft. Sie werden verworfen, wenn für Endotoxin eine Mortalität unter 80% und für Endotoxoid eine Mortalität über 10% resultiert.

Die zur Immunisierung und für Fieber- und Toleranzversuche verwendeten Injektionslösungen werden auf Blutagarplatten auf ihren Keimgehalt überprüft. Nur bei negativem Ausfall werden sie in die Versuche genommen.

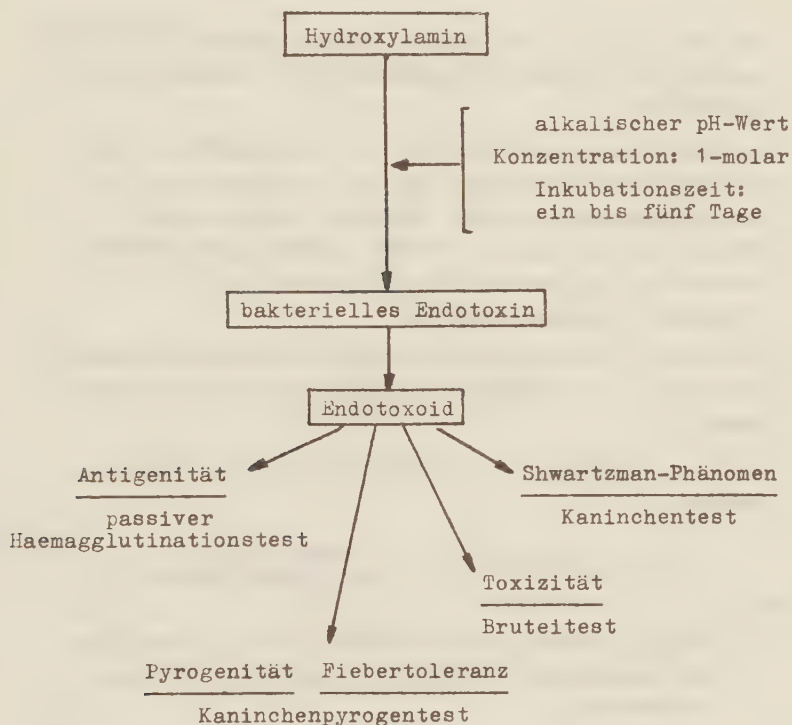
4. Bestimmung von Endotoxin-Antikörpern im passiven Haemagglutinationstest

Der passive Haemagglutinationstest wird nach Angaben von Neter (1956) durchgeführt. Eine Suspension von Schaferythrozyten in phosphatgepufferter, isotoner Kochsalzlösung vom pH 7,3 wird im Verhältnis 1:1 mit einer Endotoxinlösung (Konzentration $10 \mu\text{g/ml}$), die vorher über eine Stunde bei 100°C erhitzt wurde, gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C werden die Erythrozyten dreimal in der genannten phosphatgepufferten, isotonischen Kochsalzlösung gewaschen und auf die Endkonzentration von 2% eingestellt.

Die zu prüfenden Kaninchenserum werden vor dem Versuch eine halbe Stunde bei 56°C inaktiviert. Auf Salkplexiplatten werden mit phosphatgepufferter, isotoner Kochsalzlösung (pH 7,3) Verdünnungsreihen angesetzt (0,25 ml pro Kuppe) und mit dem gleichen Volumen der Erythrozytensuspension versetzt. Die Ablesung erfolgt nach einer Stunde bei Zimmertemperatur. Als positiv gewertet werden alle Kuppen mit einer eindeutigen Agglutination. Die Titerangabe erfolgt als $\log_2 n$ (Nowotny 1968).

Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol (Nowotny 1968): Das inaktivierte Serum wird mit einer 0,2-molaren 2-Mercaptoäthanol-Lösung (2-Mercaptoäthanol zur Synthese ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), E. Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 inkubiert. Nach 24 Stunden wird Jodacetamid (2-Jodacetamid zur Synthese ($\text{C}_2\text{H}_4\text{JNO}$), E. Merck, Darmstadt) mit der Endkonzentration von 0,06 M dazugegeben. Diese Mischung wird eine Stunde bei 4°C gehalten. Danach erfolgt eine ausgiebige, 24-stündige Dialyse gegen eine isotonische, phosphatgepufferte Kochsalzlösung vom pH 7,3.

Abb. 4 : Schematische Darstellung der Behandlung bakteriellen Endotoxins mit Hydroxylamin (NH_2OH) und der Prüfung des dabei entstehenden Produktes



II. Ergebnisse

1. Die Bestimmung der LD₅₀ des bakteriellen Lipopolysaccharides und des entsprechenden Endotoxoids im Brutei

Die Abb. 4 zeigt die Dosis-Wirkungsbeziehung von nativem und 5 Tage mit 1-molarem NH₂OH behandeltem Endotoxin.

Die NH₂OH-Vorbehandlung wird bei einem pH-Wert von 8,6 und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Kontrollansätze (natives Endotoxin) weisen einen pH-Wert von 9,6 auf. Es werden 11 Tage alte Bruteier verwendet, die jeweils 0,1 µg Substanz in 0,1 ml Flüssigkeitsvolumen erhalten.

Die Mortalität wird als Prozentsatz der abgestorbenen Bruteier zu der Gesamtzahl der gespritzten Eier angegeben.

Die LD₅₀ wird nach der Formel von Munch und Reed berechnet:

$$- \lg \text{LD}_{50}\text{-Titer} = - \lg \left(\frac{\text{Verdünnung mit}}{>50\% \text{ Sterblichkeit}} \right) + y$$

y = proportionaler Abstandsfaktor, multipliziert mit dem Logarithmus des Verdünnungsfaktors (Serumverdünnung)

$$\text{proportionaler Abstandsfaktor} : \frac{\% \text{ Sterblichkeit} > 50\% - 50\%}{\% \text{ Sterblichkeit} > 50\% - \% \text{ Sterblichkeit} < 50\%}$$

$$\text{LD}_{50} - \text{Titer} = 10^{- \lg \text{LD}_{50}\text{-Titer}}$$

Abb. 4 : Bestimmung der LD₅₀ von E.coli 026 : B6 - LPS
und des entsprechenden Endotoxoids (s. Tab. 2)



Bemerkungen: •—• Natives LPS
 ○—○ Endotoxoid (1M NH₂OH)
 x---x Endotoxoid (2M NH₂OH)

LD₅₀ für natives E.coli-LPS = $2,57 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \text{Ei}$
 LD₅₀ für NH₂OH-vorb. E.coli-LPS = $6,6 \mu\text{g} / \text{Ei}$

Es besteht eine logarithmische Beziehung zwischen der Mortalität und der applizierten Endotoxin- bzw. Endotoxoid-Dosis. Beide Kurven haben etwa den gleichen Steigungsgrad. Die Werte des Endotoxoids liegen um 2 Zehnerpotenzen über denen des Endotoxins. 1- und 2-molares NH₂OH besitzen etwa den gleichen Inaktivierungseffekt.

Tabelle 2 : Anzahl der je Dosis und Substrat untersuchten Bruteier

Dosis pro Ei (μg)	natives Endotoxin		Endotoxoid (5 Tage verb.) 1M NH ₂ OH		Endotoxoid (5 Tage verb.) 2M NH ₂ OH	
	Eierzahl ges./tot	Mort. (%)	Eierzahl ges./tot	Mort. (%)	Eierzahl ges./tot	Mort. (%)
5×10^1	--	--	30/30	100%	19/18	95%
10^1	--	--	32/34	73%	17/13	77%
5×10^0	15/15	100%	31/14	45%	16/7	44%
10^0	18/18	100%	31/7	19%	18/3	16,6%
5×10^{-1}	33/31	94%	30/1	3,3%	--	--
10^{-1}	38/29	76%	25/1	4%	--	--
5×10^{-2}	43/23	55%	--	--	--	--
10^{-2}	37/14	38%	--	--	--	--
10^{-3}	35/1	2,9%	--	--	--	--

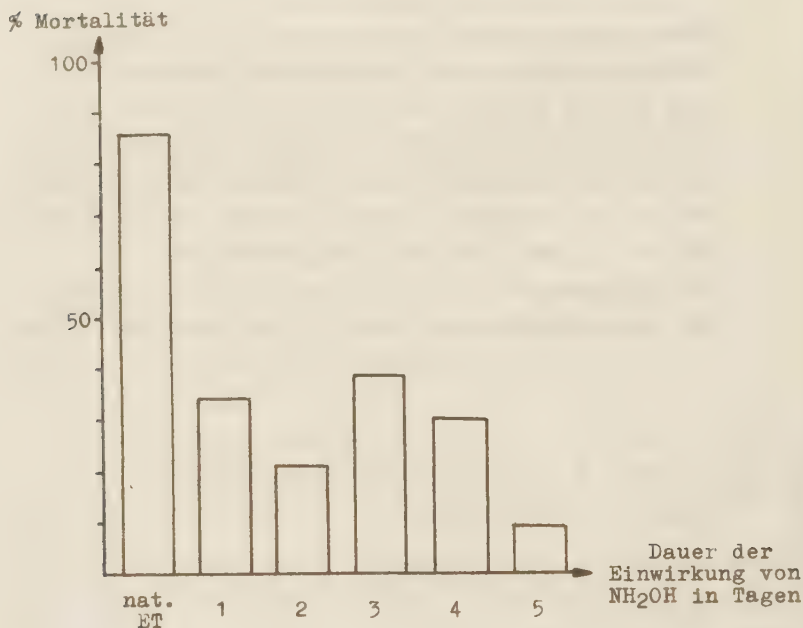
2. Die Toxizität des nativen und des mit NH_2OH
vorbehandelten Endotoxins für das Brutei

Im folgenden werden die Ergebnisse der Toxizitätsstudien graphisch und tabellarisch dargestellt.

Nach 1- und 2-tägiger NH_2OH -Vorbehandlung des Endotoxins ist eine Toxizitätsminderung auf 34,3% bzw. auf 22,6% zu erkennen. Nach 3-tägiger Inaktivierung steigt die Toxizität wieder auf Werte von 38,4% an, um nach 5 Tagen bis auf 8,35% abzufallen.

Die angegebenen Werte sind jeweils in zwei Versuchen mit unterschiedlichen Präparationen gewonnen worden.

Abb. 5 : Ergebnisse der Toxizitätsstudien (nach Tab. 3)



Tab. 3 : Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen über die Toxizität von nativem und mit NH₂OH vorbehandeltem Endotoxin für das Brutei

	Inkubationsdauer in Tagen				
	1	2	3	4	5
Mortalität d. Endotoxoid (gesamt/tot)	35/12	31/7	26/10	28/8	36/2
	34,3%	22,6%	38,4%	28,6%	8,4%
Mortalität d. Endotoxin (gesamt/tot)	10/8	11/9	10/10	10/9	11/9
	80%	82%	100%	90%	82%

3. Der Einfluß von humoralen Endotoxin-Antikörpern
auf die eitoxische Wirkung von nativem und mit
NH₂OH vorbehandeltem Endotoxin

Humorale Antikörper gegen bakterielles Endotoxin (Kaninchenserum) werden mit nativem Endotoxin bzw. mit NH₂OH-vorbehandeltem Endotoxin im Verhältnis 1:5 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert; das Gemisch wird Bruteiern gespritzt. Die Kontroll- und Antiseren werden 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert.

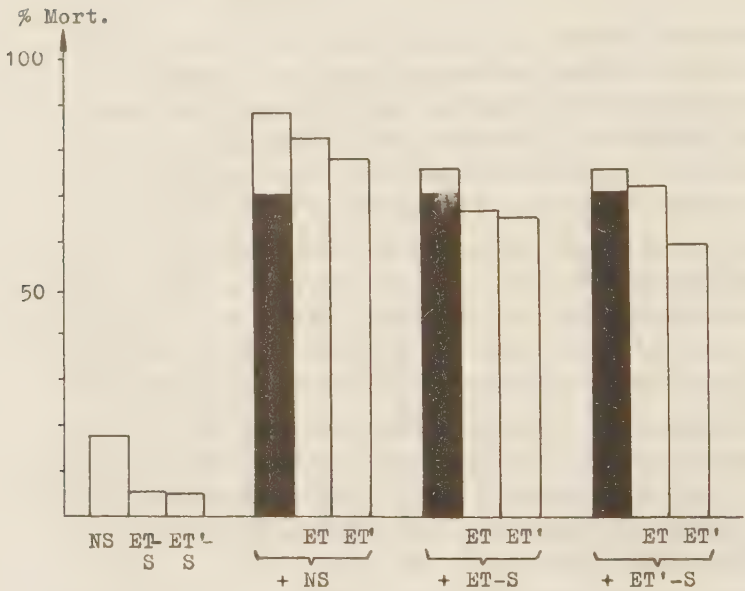
In Vorversuchen wurde die Eigentoxizität der Seren im Brutei bestimmt. In einer Verdünnung von 1:5 in physiologischer Kochsalzlösung erweisen sich die Antiseren als wenig toxisch (4,1% bzw. 4,6%), während die Kaninchennormalseren eine Toxizität von 17,2% zeigen.

Die gewählte Endotoxin-Dosis wird nach der in B.II.1 dargestellten Dosis-Wirkungs-Beziehung auf eine LD₇₀ eingestellt. Danach liegt die Endotoxin-Endkonzentration bei 0,08 µg / 0,1 ml / Ei und die Endotoxoid-Endkonzentration bei 8 µg / 0,1 ml / Ei.

Gemische von Normalseren mit Endotoxin bzw. Endotoxoid führen zu Mortalitätsraten, die über der LD₇₀ liegen, während die Gemische mit Antiseren eine nahezu unverminderte letale Wirkung von Endotoxin bzw. Endotoxoid erkennen lassen. Nur Endotoxoid-Antiseren zeigen zusammen mit Endotoxoid eine leicht verminderte Toxizität.

Insgesamt ergibt sich demnach in diesem Testsystem kein reproduzierbarer Einfluß von humoralen Endotoxin-Antikörpern auf die Toxizität von Endotoxin bzw. Endotoxoid.

Abb. 6 : Graphische Darstellung der Ergebnisse über den Einfluß von humoralen Endotoxin-Antikörpern auf die eitoxische Wirkung von nativem und mit NH_2OH vorbehandeltem Endotoxin



Tab. 4 : tabellarische Übersicht der in Abb. 6 dargestellten Versuche

Serum	NaCl		Endotoxin (0,008 µg/Ei)		Endotoxoid (8 µg/Ei)	
NS	29/5	17,2%	27/22	81,6%	26/20	77%
ET-S	21/1	4,6%	38/25	66%	28/18	64%
ET'-S	27/1	4,1%	34/24	70,6%	32/19	59%

Bemerkungen: NS = Normalserum

ET-S = Endotoxin-Antikörperserum

ET'-S = Endotoxoid-Antikörperserum

 = errechnete Mortalität aus LD₇₀
 und der Eigentoxizität der Seren

4. Die Wirkung von nativem bzw. mit NH_2OH vorbehandeltem LPS im Kaninchenpyrogentest

Auch zu diesen Untersuchungen werden das native Endotoxin und das Endotoxoid, das 1 bis 5 Tage mit 1-molarem NH_2OH vorbehandelt worden war, herangezogen.

Den Kaninchen wird jeweils $1 \mu\text{g}$ Endotoxin bzw. $1 \mu\text{g}$ Endotoxoid in 10 ml pyrogenfreier, physiologischer Kochsalzlösung intravenös injiziert.

Die Temperaturverläufe zeigen, daß nach 1-tägiger Einwirkung von NH_2OH auf bakterielles Endotoxin dessen pyrogene Aktivität noch weitgehend unbeeinflusst bleibt (s. Abb. 7.A). Nach 2-tägiger Inaktivierung sieht man eine deutlichere Demarkierung des ersten gegenüber dem zweiten Gipfel. Eine wesentliche Änderung des Fieberverlaufes ergibt sich erst nach einer NH_2OH -Inaktivierung von 3 Tagen: der Temperaturanstieg ist verzögert und in der späten Phase (nach 3 Stunden) bildet sich ein Temperaturplateau aus, das unter dem der frühen Fieberphase liegt. Diese Abflachung des zweiten Gipfels ist nach 4-tägiger NH_2OH -Behandlung des Endotoxins vollständig. Es kommt zu einem Anstieg der Temperatur, die innerhalb von 3 Stunden wieder auf Normalwerte absinkt. Eine 5-tägige Inaktivierung mit NH_2OH führt bei der verwendeten LPS-Charge zu einem völligen Verlust der Pyrogenität für Kaninchen; bei einer anderen Charge ist es zu einem deutlichen Temperaturanstieg gekommen (s. Abb. 7.D).

Die Endotoxoid-bedingte Fieberwirkung ist (wie die von Endotoxin) dosisabhängig. Nach intravenöser Gabe von $10 \mu\text{g}$ Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH inaktiviert) bildet sich ein Temperaturmaximum von ca. $1,2^\circ\text{C}$ aus. 3 Stunden nach der Injektion ist ein Temperaturplateau vor dem endgültigen Absinken auf Ausgangswerte zu beobachten.

Nach 1- bis 5-tägiger Einwirkung von 1-molarem NH_2OH auf natives LPS kommt es zu einer stufenweisen Reduktion



Tabell. 7.A: Der Einfluss der Dauer der Einwirkungszeit von NH_2OH auf die pyrogene Wirkung des bakteriellen Endotoxins

Bemerkungen: (a) unvorbehandeltes Endotoxin
Einzeldosis je Tier: $1 \mu\text{g}$

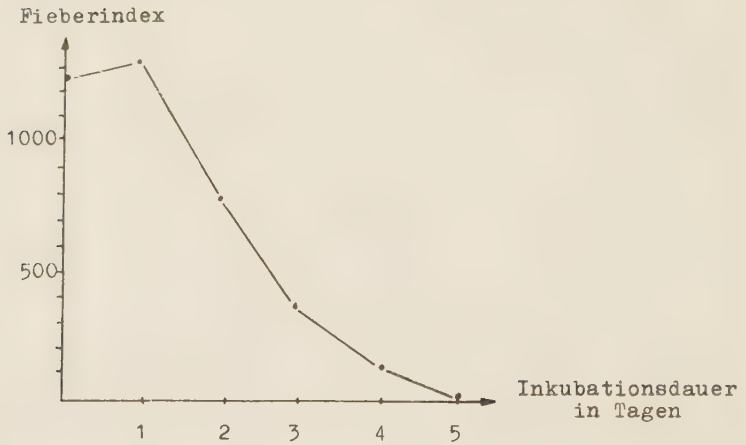
Endotoxin in 10 ml pyrogenfreier,
physiologischer Kochsalzlösung

Anzahl der Tiere: 6

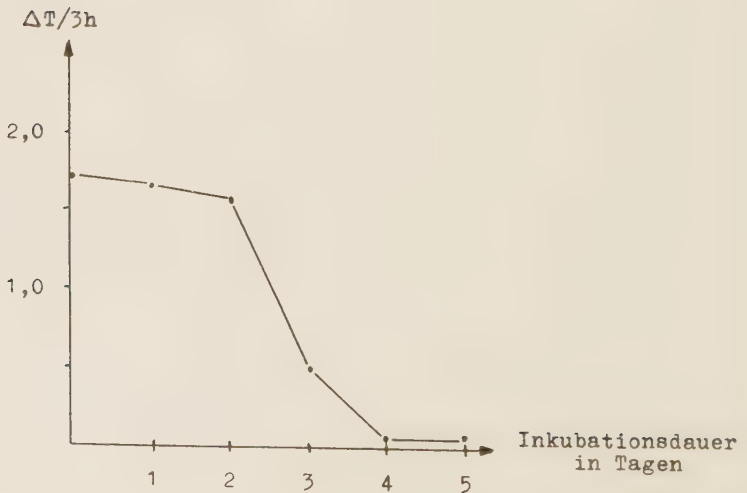
- (b) Endotoxid (1 Tag vorb.)
 - (c) Endotoxid (2 Tage vorb.)
 - (d) Endotoxid (3 Tage vorb.)
 - (e) Endotoxid (4 Tage vorb.)
 - (f) Endotoxid (5 Tage vorb.)
- Einzeldosis je Tier: $1 \mu\text{g}$ Endotoxid
in 10ml pyrogenfreier, physiologi-
scher Kochsalzlösung
Prüfung der einzelnen Präparationen
mit jeweils 2 Tieren

der pyrogenen Wirkung des Endotoxins. Deutlich tritt dieser Effekt vor allem nach dreitägiger Inkubation hervor. Ein erster Gipfel bleibt nach Gabe des Endotoxoids erhalten; der zweite Gipfel wird dosisabhängig stark reduziert oder ganz unterdrückt.

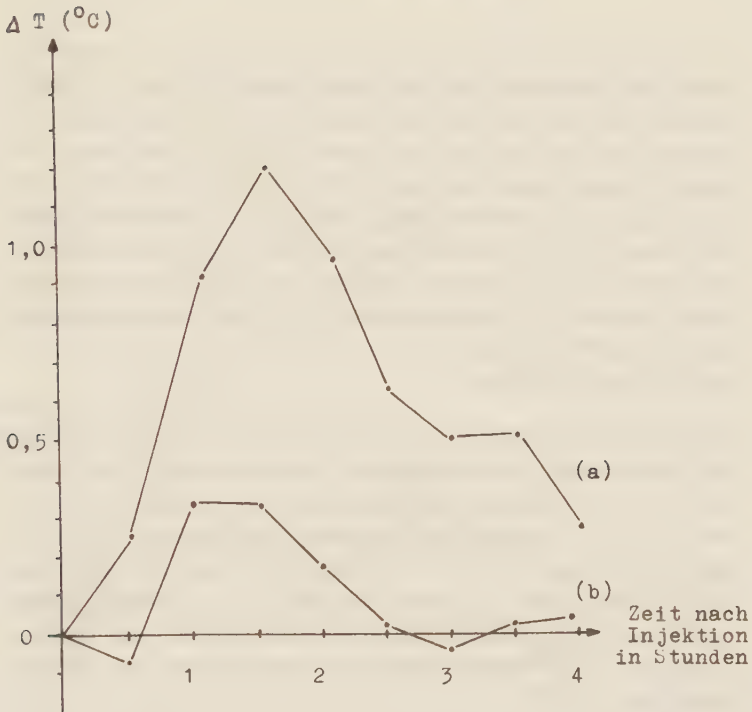
Teilabb. 7.B : Zusammenhänge zwischen Fieberindex und Dauer der Inaktivierung von Endotoxin mit NH_2OH (Werte s. Teilabb. 7.A)



Teilabb. 7.C : Graphische Darstellung der Temperaturhöhe 3 Stunden nach Injektion (Werte s. Teilabb. 7.A)



Teilabb. 7.D : Die Wirkung unterschiedlicher Endotoxoid-
dosen im Kaninchenpyrogentest



Bemerkungen: (a) Anzahl der Tiere: 2

Dosis: $10 \mu\text{g}$ Endotoxoid (5 Tage vorb.)
in 10 ml pyrogenfreier Kochsalz-
lösung (intravenös)

(b) Anzahl der Tiere: 2

Dosis: $1 \mu\text{g}$ Endotoxoid (5 Tage vorb.) in
10 ml pyrogenfreier Kochsalz-
lösung (intravenös)

5. Vergleich zwischen bakteriellem Endotoxin und Endotoxoid bezüglich ihrer Fiebertoleranz- induzierenden Wirkung

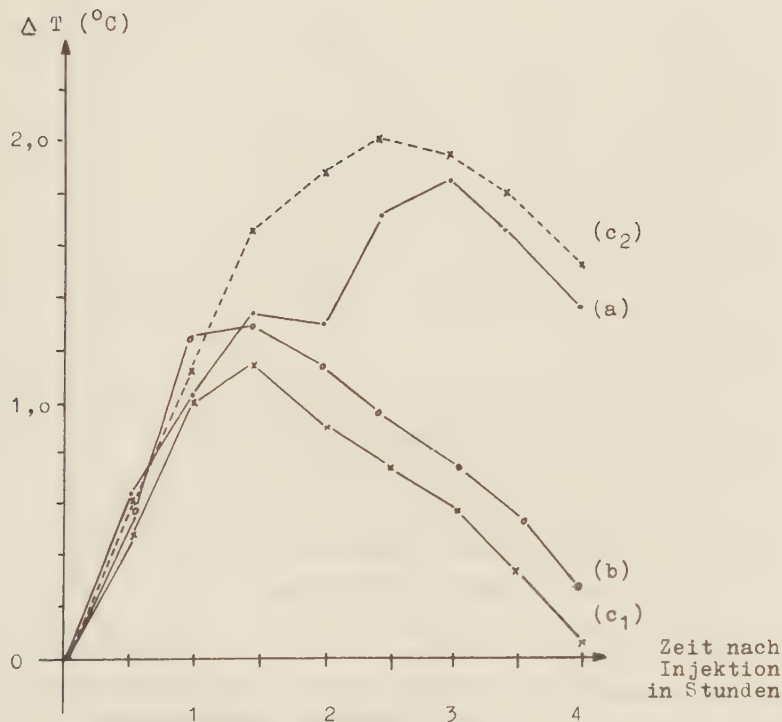
Bisher wurde gefunden, daß intensiv mit NH_2OH vorbehandeltes bakterielles Endotoxin seine Toxizität und Pyrogenität weitgehend verliert. Im folgenden soll geprüft werden, ob das Endotoxoid noch in der Lage ist, eine Toleranz gegenüber dem nativen Endotoxin zu induzieren. Hierzu werden Kaninchen an 8 aufeinanderfolgenden Tagen mit Endotoxin bzw. Endotoxoid vorgespritzt. Die Einzeldosis beträgt jeweils $10 \mu\text{g}$ pro Tier und Tag. Nach weiteren 8 Tagen schließt sich der Toleranzversuch an, bei dem den Tieren jeweils $1 \mu\text{g}$ Endotoxin intravenös gespritzt wird.

Die Versuche zeigen, daß 5 Tage mit NH_2OH vorbehandeltes Endotoxin noch in der Lage ist, eine dem nativen Endotoxin vergleichbare Fiebertoleranz zu erzeugen (s. Abb. 8 A). Es kommt zur typischen Abflachung der zweiten Fieberphase, aber nur zu einer geringen Reduktion der frühen Phase (s. auch Greisman et al. 1970). Dieses Verhalten wird insbesondere bei Darstellung der durchschnittlichen Temperaturerhöhung nach 3 Stunden ($\Delta T/3h$) deutlich (s. Abb. 8.B).

Allerdings reagieren nicht alle Tiere gleichartig auf die Gabe von Endotoxin. Einige der mit Endotoxoid vorbehandelten Kaninchen reagieren auf die Zufuhr von nativem Endotoxin mit ungewöhnlich hohen Fieberreaktionen (Ausdruck einer allergischen Hyperreaktivität ?)

Nach Gaben von $1 \mu\text{g}$ Endotoxoid bleiben sowohl die mit Endotoxin als auch die mit Endotoxoid vorbehandelten Tiere fieberfrei (s. Abb. 8.D).

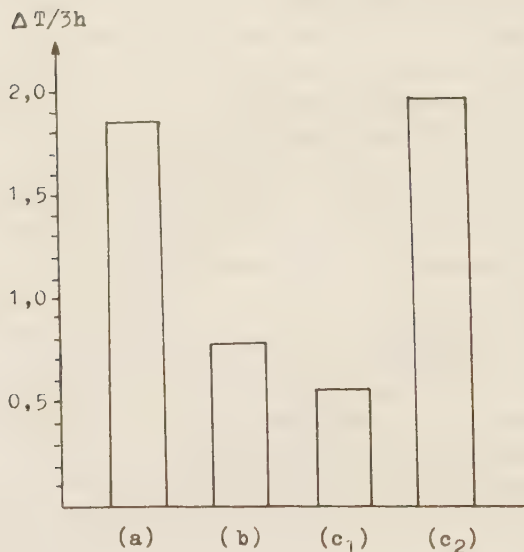
Abb. 8 : Ergebnisse der Fiebertoleranzversuche am Kaninchen mit nativem bzw. mit NH_2OH inaktiviertem Endotoxin



Teilabb. 8.A : Prüfung der Fiebertoleranz mit $1\text{ }\mu\text{g}$ nativem Endotoxin

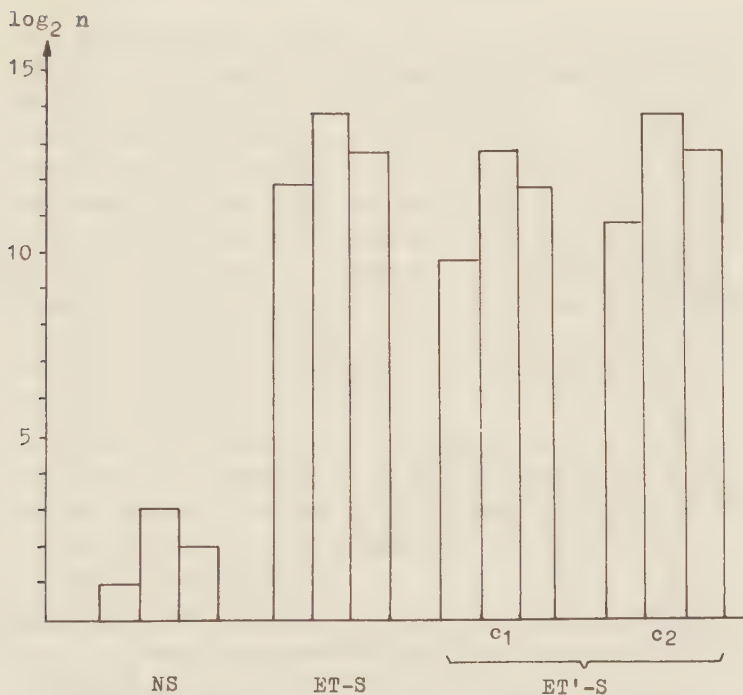
- (a) 4 unvorbehandelte Kontrolltiere
- (b) 9 mit Endotoxin vorbehandelte Kaninchen
- (c₁) 6 mit Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH inaktiviert) vorbehandelte Kaninchen
- (c₂) 4 mit Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH inaktiviert) vorbehandelte Kaninchen

Teilabb. 8.B : Graphische Darstellung der Temperaturerhöhung 3 Stunden nach Injektion des nativen bakteriellen Endotoxins (s. Teilabb. 8.A)



- Bemerkungen:
- (a) 4 unvorbehandelte Kontrolltiere
 - (b) 9 mit Endotoxin vorbehandelte Kaninchen
 - (c₁) 6 mit Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH inaktiviert) vorbehandelt
 - (c₂) 4 mit Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH inaktiviert) vorbehandelt

Teilabb. 8.C : Antikörpertiter fiebertoleranter Kaninchen
(Tiere s. Teilabb. 8.A)



Bemerkungen:

NS = Normalseren der Tiere vor Versuchsbeginn

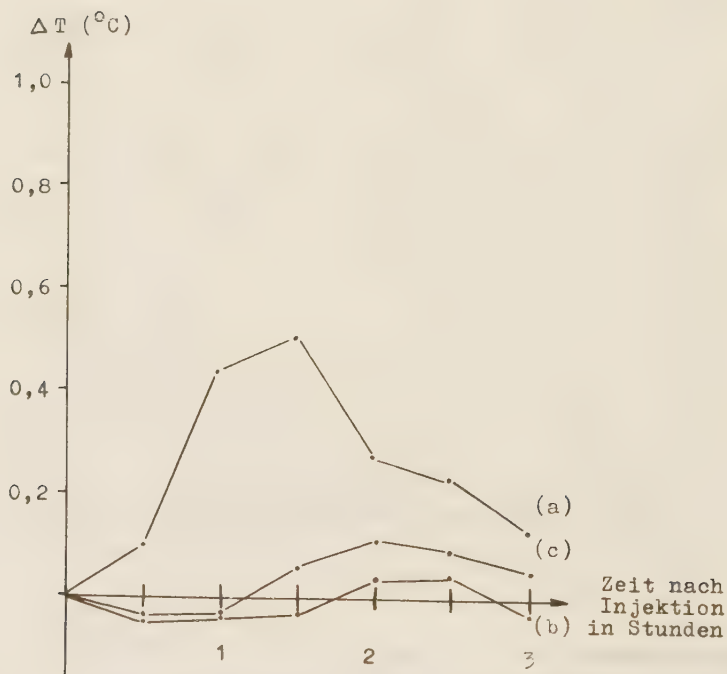
ET-S = Endotoxin-Antikörperseren
(gewonnen nach Gabe von je 10 μ g Endotoxin
an 8 aufeinanderfolgenden Tagen und einer
Latenz von weiteren 7 Tagen)

ET'-S = Endotoxoid-Antikörperseren
(gewonnen nach Gabe von je 10 μ g Endotoxoid
an 8 aufeinanderfolgenden Tagen und einer
Latenz von weiteren 7 Tagen)

c₁ = gegenüber Endotoxin tolerante Kaninchen

c₂ = Endotoxoid-vorbehandelte Tiere, die auf
eine Endotoxin-Injektion mit starkem,
doppelgipfligen Fieber reagieren

Teilabb. 8.D. : Prüfung der Fiebertoleranz mit $1 \mu\text{g}$
mit NH_2OH -vorbehandeltem Endotoxin



- Bemerkungen: (a) 2 unvorbehandelte Kontrolltiere
(b) 6 mit Endotoxin vorbehandelte Kaninchen
(c) 5 mit Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH vorbehandelt) vorbehandelte Kaninchen

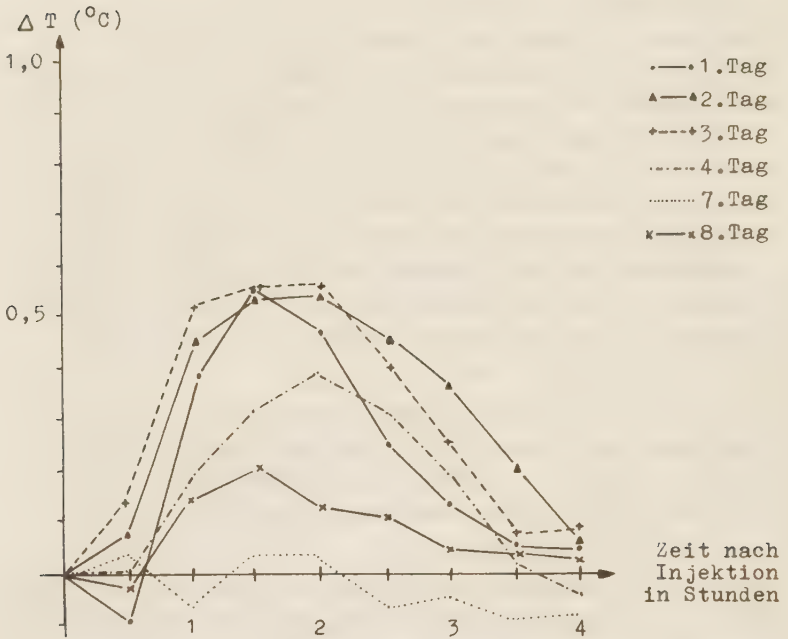
6. Die Fiebertoleranz-Entwicklung nach mehrmaligen Gaben von Endotoxoid

Nach mehrmaliger intravenöser Zufuhr von bakteriellem Endotoxoid (5 Tage mit 1-molarem NH_2OH inaktiviert) kann man beim Kaninchen sowohl gegenüber Endotoxoid als auch gegenüber Endotoxin eine Toleranz erzeugen. Um den Verlauf der Änderung der Temperaturantwort gegenüber Endotoxoid zu ermitteln, werden Kaninchen an mehreren Tagen mit dem Endotoxoid gespritzt und ihre Körpertemperatur gemessen. Die ersten 4 intravenösen Injektionen erhalten die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen, die beiden letzten werden am 7. und 8. Tag nach der ersten Gabe gespritzt. Die Einzeldosis beträgt jeweils $1 \mu\text{g}$ pro Tier.

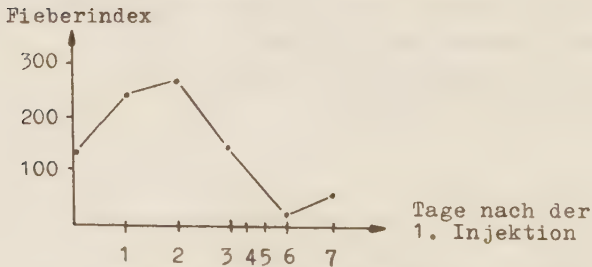
Eine deutliche Reduktion der Fieberantwort zeigt sich erst nach drei Tagen (= 4. Injektion). Am 7. und 8. Tag ist sie evident: bei keinem Tier kommt es zu einer Steigerung der Ausgangsrektaltemperatur über $0,25^\circ\text{C}$ (s. Abb. 9.A und 9.C).

Nach einer intravenösen Gabe von $1 \mu\text{g}$ Endotoxin 14 Tage nach der ersten Endotoxoid-Applikation zeigen alle Tiere die typische inkomplette Fiebertoleranz (s. Abb. 9.D).

Abb. 9 : Ergebnisse der Fiebertoleranzentwicklung nach mehrmaliger Gabe von Endotoxoid

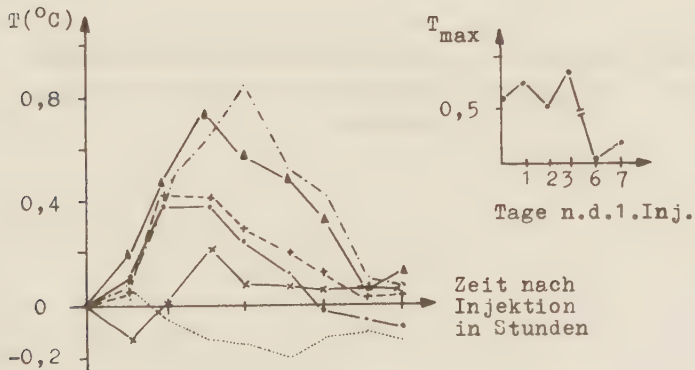
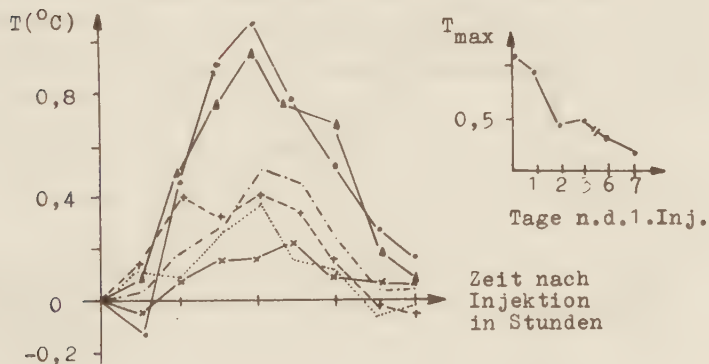
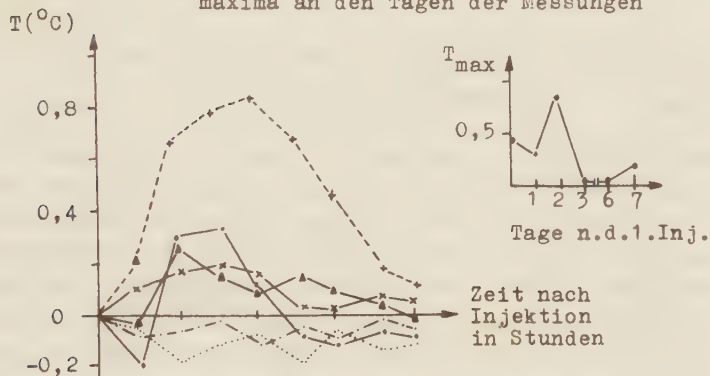


Teilabb. 9.A : Übersicht über die Fieberverläufe von 3 Kaninchen (Mittelwerte der Temperaturmessungen) nach täglicher Applikation von je $1 \mu g$ Endotoxoid in 10 ml physiologischer, pyrogenfreier Kochsalzlösung

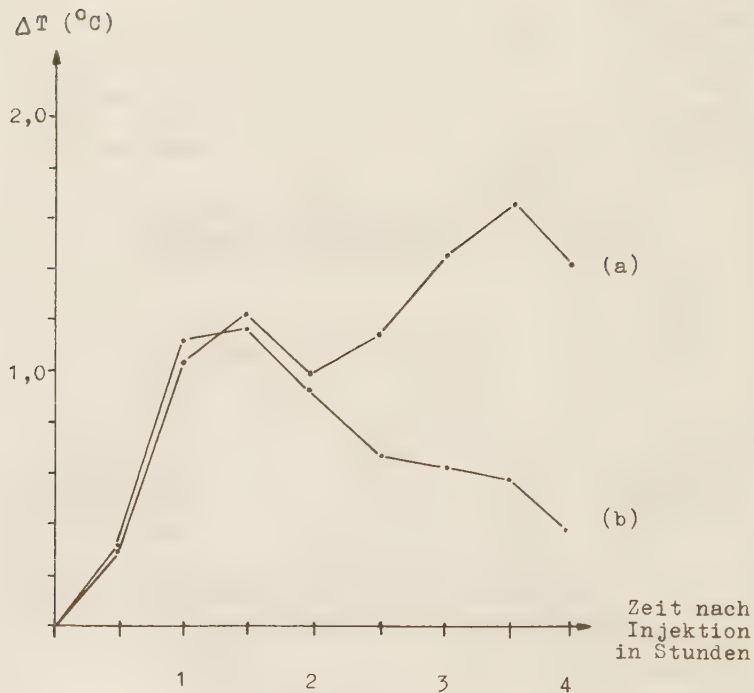


Teilabb. 9.B : Fieberindices aus Werten der Teilabb. 9.A

Teilabb. 9.C : Ergebnisse der Einzelmessungen der in Teilabb. 9.A angeführten Versuche (tägliche Applikation von Endotoxoid) und zusätzliche Darstellung der Temperaturmaxima an den Tagen der Messungen



Teilabb. 9.D : Prüfung der Fiebertoleranz mit $1\mu\text{g}$
nativem Endotoxin an 3 gegenüber Endotoxoid
toleranten Kaninchen (s. Teilabb. 9.A-C)



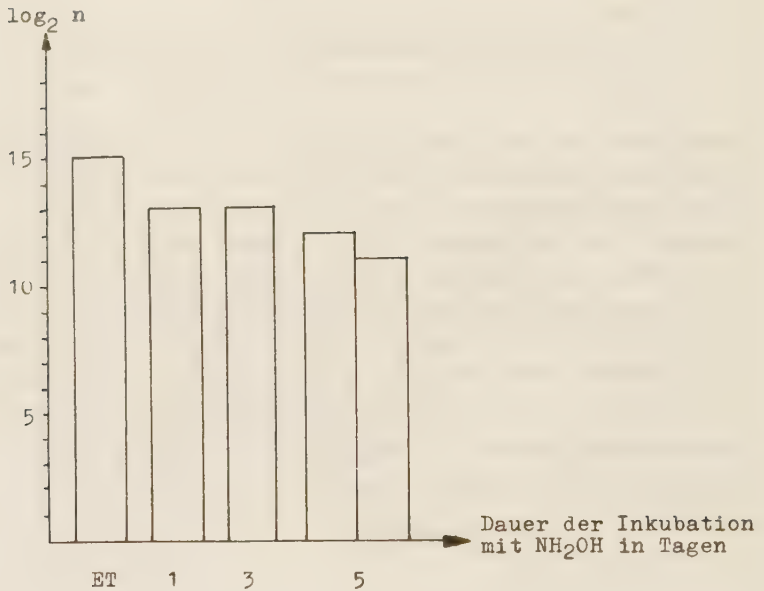
Bemerkungen: (a) 2 unvorbehandelte Kontrolltiere
(b) 3 gegenüber Endotoxoid tolerante
Kaninchen

7. Nachweis der antigenen Wirkung von bakteriellem
Endotoxin bzw. Endotoxoid im passiven Haem-
agglutinationstest

a) Homologer Antikörpertiter nach Endotoxin- und
Endotoxoid-Einzelgabe

Den Kaninchen wird zunächst eine Dosis von $10 \mu\text{g}$ Endotoxin bzw. $10 \mu\text{g}$ Endotoxoid (Inkubation von 1, 3 und 5 Tagen) intravenös injiziert. Nach einer Woche wird der Antikörpertiter des Serums bestimmt. Dabei zeigt sich, daß die Höhe des Haemagglutinationstiters von der Dauer der Einwirkung von NH_2OH auf das native Endotoxin abhängt (a. Abb. 10.A). Die höchsten Titer induziert das native LPS, während nach Gabe von 5 Tage mit NH_2OH inaktiviertem Endotoxin die geringste Antikörperbildung meßbar ist. Die Versuche werden mit Präparationen gemacht, die von einem Endotoxin-Ansatz ausgehen.

Abb. 10 : Der Einfluß der Einwirkungszeit von NH_2OH
auf die Antigenität des nativen Endotoxins



Teilabb. A : Ergebnisse der Antikörperbestimmung
nach einmaliger Endotoxin- bzw. Endotoxoid-
Gabe (Auswertung nach einer Woche)

b) Homologer Antikörpertiter nach mehrmaligen
Gaben von Endotoxin bzw. Endotoxoid

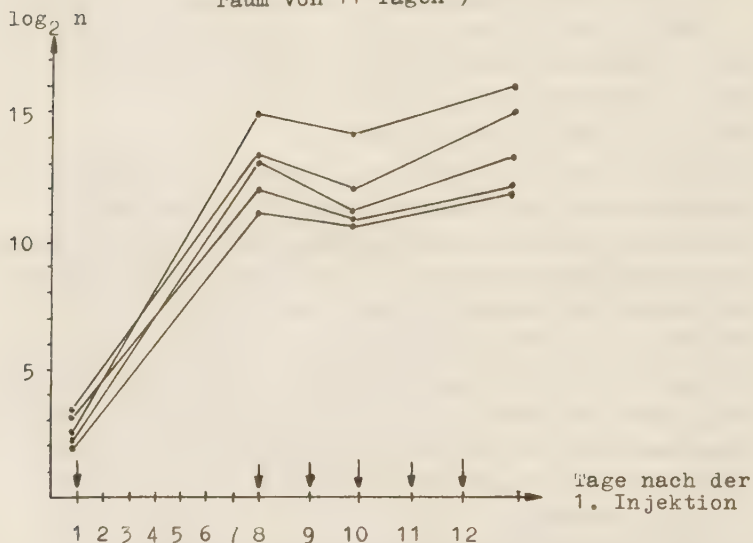
Spritzt man Kaninchen (Weiterbehandlung der Tiere unter 7.a)) nach einer Latenzzeit von einer Woche an weiteren 5 folgenden Tagen Endotoxin bzw. Endotoxoid (Einzeldosis jeweils $10 \mu\text{g}$ pro Tier und Tag), so erhöht sich der Antikörpertiter noch um ein bis zwei Stufen, d.h. um 50 bis 75% (s. Abb. 10.B).

Dieser Antikörperspiegel läßt sich ohne ständigen antigenen Stimulus nicht aufrechterhalten. Zieht man die durchschnittlichen Haemagglutinationstiter 16 Tage nach der ersten Injektion (s. Abb. 8.C) zum Vergleich heran, so liegen sie um zwei bis drei Stufen niedriger (s. auch bei Mulholland et al. 1965).

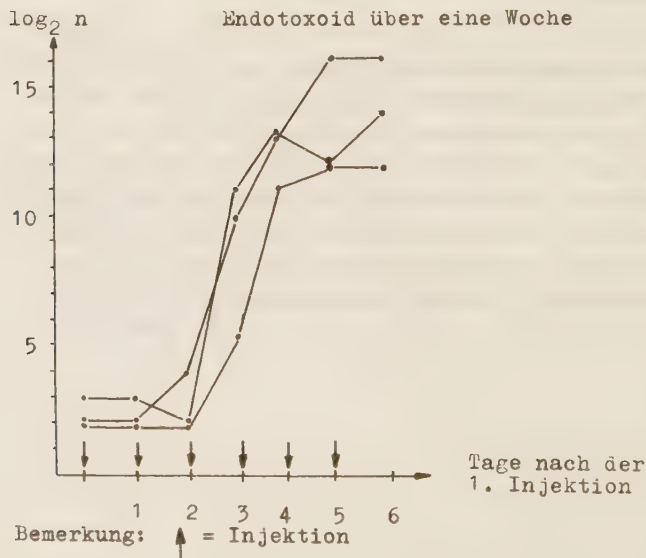
In einer anderen Versuchsreihe werden Kaninchen 6 Tage lang hintereinander mit je $10 \mu\text{g}$ Endotoxin bzw. $10 \mu\text{g}$ Endotoxoid (5 Tage mit NH_2OH vorbehandelt) intravenös gespritzt. Den Tieren wird täglich Blut zur Serumgewinnung entnommen. Man sieht (s. Abb. 10.C), daß am 3. Tag spezifische Endotoxin-Antikörper nachweisbar werden, deren Menge bis zum 5. Tage zunimmt (s. auch bei Rudbach 1971).

Zwischen der Höhe des Antikörpertiters und der Fiebertoleranz besteht keine Korrelation (s. dazu auch B.II.5). Die mit nativem Endotoxin vorbehandelten Tiere weisen regelmäßig einen höheren Antikörpertiter auf als die mit Endotoxoid vorbehandelten Kaninchen. Dennoch gleichen sich Endotoxin und Endotoxoid in bezug auf ihre Fiebertoleranz-induzierende Wirkung. Tiere, die nach Endotoxoid-Vorbehandlung im Toleranzversuch eine besonders starke Temperaturantwort zeigen, weisen Antikörpertiter auf, die sich von denen toleranter Tiere nicht unterscheiden.

Teilabb. 10.B : Ergebnisse der Antikörperbestimmung nach mehrmaliger Gabe von Endotoxin bzw. Endotoxoid (Fortführung des in Teilabb. 10.A dargestellten Versuches über einen Zeitraum von 11 Tagen)



Teilabb. 10.C : Verlaufsbeobachtungen der Antikörpertiter nach täglicher Gabe von Endotoxin bzw. Endotoxoid über eine Woche

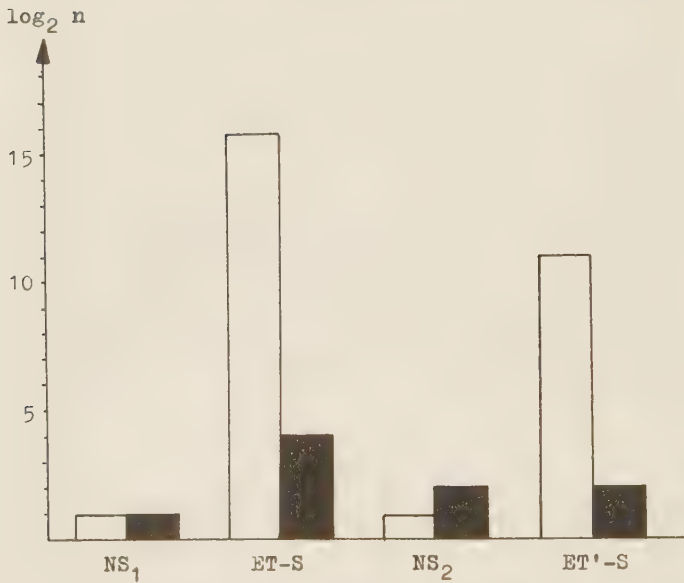


c) Heterologer Antikörpertiter nach mehrmaligen
Endotoxin- bzw. Endotoxoid-Gaben

Nach Watson und Kim (1963) und Greisman et al. (1969) sollen Kaninchen, die mehrmals mit LPS vorbehandelt werden, sowohl eine Toleranz gegen das homologe Lipopolysaccharid als auch eine Kreuztoleranz gegen heterologes Lipopolysaccharid ausbilden (z.B. E.coli-LPS - S.typhosa-LPS).

Die Ergebnisse des passiven Haemagglutinationstests machen deutlich, daß Tiere, die mit E.coli-LPS vorbehandelt sind, Antikörpertiter gegen S.typhosa-LPS besitzen, die die des Normalserums um ein geringes übertreffen. Mit Endotoxoid vorbehandelte Tiere weisen keinen erhöhten Titer gegenüber heterologem LPS auf (s. Abb. 11).

Abb. 11 : Auswertung der Antiseren gegen E.coli 026:B6-
Endotoxin mit homologem und heterologem Anti-
gen (S.typhosa-LPS)



Bemerkungen: NS_1 = Normalseren der mit Endotoxin
behandelten Tiere

ET-S = Endotoxin-Antikörperseren

NS_2 = Normalseren der mit Endotoxoid
behandelten Tiere

ET'-S = Endotoxoid-Antikörperseren

 Erythrozyten mit erhitztem
E.coli-LPS sensibilisiert

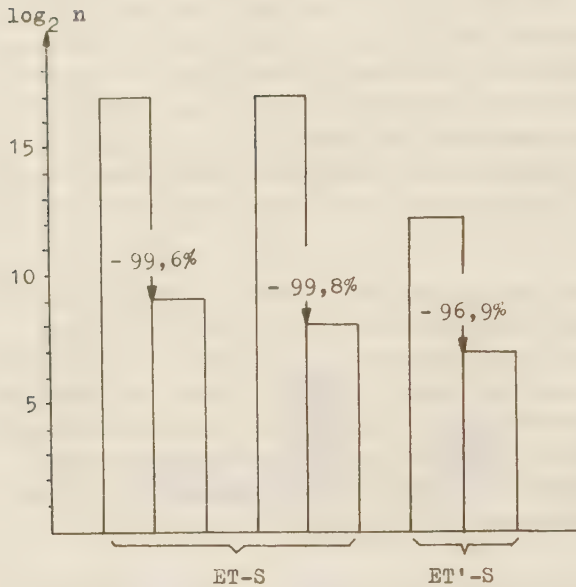
 Erythrozyten mit erhitztem
S.typhosa-LPS sensibilisiert

8. Der Einfluß von 2-Mercaptoathanol auf den Antikörper- titer der Endotoxin- und Endotoxoid-Antiseren

Nach Nowotny (1968), der die Antigenität von toxischen und detoxifizierten Endotoxin-Präparationen vergleichend untersuchte, sind die Höhe der Antikörperantwort und die Art der gebildeten Immunglobuline abhängig von der verwendeten Präparation. Als Endotoxoid verwendete er das sog. Endotoxoid-2, eine durch Kaliummethyolat entgiftete *S.marcescens*-Präparation. Er fand, daß der Anteil der Mercaptoäthanol-resistenten Antikörper nach Endotoxoid-2-Gabe geringer ist als nach Applikation des nativen Endotoxins.

Wir untersuchen Endotoxin- und Endotoxoid-Antiseren, die nach sechsmaliger intravenöser Injektion von je 10 μ g Endotoxin bzw. 10 μ g Endotoxoid pro Tier und Tag gewonnen wurden. Es zeigt sich dabei, daß der Anteil der Mercaptoäthanol-resistenten Antikörper in den Endotoxin-Antiseren zwar quantitativ höher ist, der prozentuale Anteil am gesamten Immunglobulingehalt jedoch geringer als in den Endotoxoid-Antiseren ist (s. Abb. 12).

Abb. 12: Der prozentuale Anteil von Mercaptoäthanol-resistenten Antikörpern am Gesamtimmunglobulin-gehalt der Endotoxin- und Endotoxoid-Antikörperseren



Bemerkungen: ET-S = Endotoxin-Antikörperseren

ET'-S = Endotoxoid-Antikörperseren

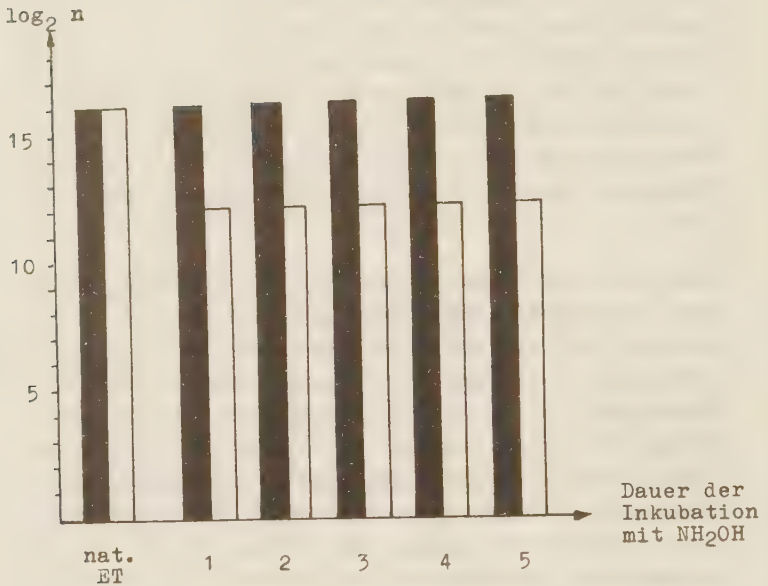
Die geprüften Antikörperseren wurden am Tag nach der letzten von 6 aufeinanderfolgenden Injektionen gewonnen

9. Die Prüfung der Bindungsfähigkeit von erhitztem
und unerhitztem Endotoxin bzw. Endotoxoid an
Hammelerythrozyten

Von verschiedenen Autoren konnte nachgewiesen werden, daß an der Zellmembran von Erythrozyten und Leukozyten (spezifische?) Endotoxinrezeptoren vorhanden sind (Noble und Koch-Weser 1966, Gimber und Rafter 1969, Springer 1970). Da die Bindung des bakteriellen Endotoxins an die Zellmembran für einige Endotoxinwirkungen eine wichtige Voraussetzung darstellt, untersuchen wir die Bindungsfähigkeit von Endotoxin und Endotoxoid an Schafererythrozyten.

Inkubiert man Schafererythrozyten mit erhitztem Endotoxin bzw. Endotoxoid (Endkonzentration $10 \mu\text{g/ml}$), so ist im Hinblick auf den Haemagglutinationstiter kein Unterschied erkennbar. Erst wenn die Präparationen in unerhitztem Zustand mit einer Erythrozytensuspension inkubiert werden, treten Titerunterschiede auf. Bei einer Endotoxin-Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ sind die Haemagglutinationstiter für erhitztes und unerhitztes Endotoxin gleich. Aber schon nach 1-tägiger Inkubation mit NH_2OH wird das LPS-Molekül so verändert, daß seine Affinität zu den Membranrezeptoren stark abnimmt (s. Abb. 13). Nach Erhitzen des mit NH_2OH vorbehandelten Endotoxins (inkubiert von einem bis zu fünf Tagen) ist die Bindungsfähigkeit an die Hammelerythrozyten erneut so groß wie die des nativen Endotoxins.

Abb. 13 : Darstellung der Bindung von erhitztem und unerhitztem nativem Endotoxin bzw. 1 bis 5 Tage mit NH_2OH vorbehandeltem Endotoxin an Hammelerythrozyten



Bemerkungen:



erhitztes Substrat



unerhitztes Substrat

10. Die Auslösung des Schwartzman-Phänomens

Wird einem Kaninchen zunächst das Endotoxin intracutan, am folgenden Tage dann intravenös gespritzt, so kommt es zu bestimmten Hautveränderungen, die nach ihrem Entdecker "Schwartzman-Phänomen" genannt werden. Die erste, "vorbereitende", intracutane Injektion führt bei unvorbehandelten Tieren zu einem lokalen Erythem. Nach der intravenösen, "provozierenden" Injektion, entwickelt sich an dieser Stelle eine haemorrhagische Nekrose. Endotoxin-tolerante Tiere zeigen keine derartige Reaktion (Kováts und Végh 1966).

Diese Befunde können unter Verwendung unserer Präparationen reproduziert werden. Die mit Endotoxoid vorbehandelten Tiere zeigen nach einer intracutanen Endotoxininjektion eine Rötung, die im Durchmesser etwas geringer ist, als die unvorbehandelter Kaninchen. Ein typisches Schwartzman-Phänomen, d.h. eine Nekrose nach der intravenösen Injektion, konnte in der Mehrzahl der Fälle nicht beobachtet werden. (s. Tab. 5)

Interessant ist die Tatsache, daß die Reaktion der Endotoxin-toleranten Kaninchen vom zeitlichen Abstand zwischen dem Beginn der Immunisierung und der intracutanen Injektion abhängt. Nach einem Zeitraum von 9 Tagen entsteht ein starkes Erythem (wie bei unvorbehandelten Tieren) ohne nachfolgende Nekrose. Beträgt der Abstand 14 Tage, wird die entzündliche Hautreaktion völlig unterdrückt (s. auch Lee und Stetson 1960).

Die Dosis für die intracutane Injektion beträgt $40 \mu\text{g}$ Endotoxin bzw. Endotoxoid, die Dosis für die intravenöse Injektion beträgt $100 \mu\text{g}$ Endotoxin pro Tier (s. auch Johnson und Nowotny 1963).

Tab. 5 : Die Auslösung des Schwartzman-Phänomens

Kaninchen	intracutane Injektionen				Δ t
	Endotoxin		Endotoxoid (5 Tage vorb.)		
unvorbehandelte Tiere	R++++	N++++	∅	∅	∅
	R++++	N++++	∅	∅	
Endotoxin- vorbehandelt	R++++	∅	∅	∅	9 Tage
Endotoxoid (5 Tage vorb.) vorbehandelt	R++	∅	∅	∅	
	R+	∅	∅	∅	
Endotoxin- vorbehandelt	∅	∅	∅	∅	14 Tage
Endotoxoid (1 Tag vorb.)- vorbehandelt	R +++	∅	∅	∅	
	R++	∅	R(+)	∅	
Endotoxoid (3 Tage vorb.)- vorbehandelt	R++	∅	∅	∅	
Endotoxoid (5 Tage vorb.)- vorbehandelt	R +++	N +++	∅	∅	
	R (+)	∅	∅	∅	

Bemerkungen: R = Rötung

N = Nekrose

Δt = Zeitraum zwischen dem Beginn der Immunisierung und der intracutanen Injektion

Stärke der Reaktion: +++++ > 3 cm Durchmesser
 +++ 2-3 cm Durchmesser
 ++ 1-2 cm Durchmesser
 + 1 cm Durchmesser
 (+) > 1 cm Durchmesser und flüchtig

C. D I S K U S S I O N

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Herstellung eines bakteriellen Endotoxoids. Neter (1968) definiert Endotoxioide als "solche Endotoxin-Derivate, die verminderte toxische 'Nebenwirkungen' hervorbringen, die aber ihre Fähigkeit, eine unspezifische Resistenz gegenüber Infektionen, den Adjuvanseffekt und eine spezifische Antikörperbildung zu stimulieren, beibehalten haben".

In vorangegangenen Studien hat Schmidt (1970) festgestellt, daß durch mehrtägige Behandlung von E.coli O 26 : B 6 - LPS mit einmolarem alkalischen Hydroxylamin dessen eitoxische Wirkung weitgehend zerstört werden kann. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluß Hydroxylamin auf andere, biologisch wichtige Endotoxin-Eigenschaften ausübt. Hierzu ist erforderlich, die Aktivitäten nativer und vorbehandelter bakterieller Endotoxine vergleichend zu untersuchen. Theoretisch ist denkbar, daß man mit Hilfe von Hydroxylamin ein Endotoxoid im Sinne der Definition Neters herstellen kann.

Bevor auf die Ergebnisse dieser Arbeit im einzelnen eingegangen wird, sollen die vermuteten Zusammenhänge zwischen den vielfältigen biologischen Aktivitäten in heutiger Sicht kurz zusammengestellt werden, soweit sie für das Verständnis und die Interpretation unserer Resultate wichtig sind.

Nach der in Abb. 14 dargestellten Hypothese resultiert die "Endotoxizität" aus zwei voneinander abhängigen Komponenten: (1) den primären toxischen Reaktionen, die an die anscheinend nicht-antigene Lipidfraktion (Lipid A) gebunden sind, und (2) den sekundären toxischen Manifestationen, die bei nicht-toleranten Tieren auf der Basis von Hyperreaktivitätsreaktionen ablaufen. Die primäre Toxizität bewirkt den ersten Fiebergipfel, die Gewebsschädigung und die Letalität. Die sekundäre Toxizität, auf der die positive Hautreaktion, das Schwartzman-Phänomen, die verstärkte letale Wirkung und der zweite Fiebergipfel beruhen, entwickelt sich

durch klinische bzw. subklinische Infektionen oder durch Kontakt mit Darmkeimen. Diese individuell unterschiedliche, erworbene Reaktionsbereitschaft läßt sich durch wiederholte Endotoxingaben im Sinne einer "zellulären Desensibilisierung" (Greisman et al. 1965) ändern.

Dieser Zustand wird allgemein als Toleranz bezeichnet. Toleranz beinhaltet einmal das Auftreten von (hauptsächlich) Mercaptoäthanol-empfindlichen Immunglobulinen der Klasse 19 S, die zum großen Teil O-Antikörper sind, und zum anderen eine verstärkte RHS-Aktivität, die durch entsprechende Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelöst wird. Die Immunglobuline werden als Opsonine angesehen, die die Endotoxin-Clearance unterstützen. In wie weit daneben protektive, neutralisierende 7 S - Immunglobuline gebildet werden, ist noch unklar.

Aus dem Gesagtem läßt sich ableiten, daß diese Endotoxin-Toleranz inkomplett ist. Die sekundär toxischen Wirkungen können zuvor abgeschwächt oder sogar eliminiert werden, aber die primären oder direkten toxischen Wirkungen bleiben unvermindert erhalten.

Die von uns geprüften toxischen, pyrogenen und antigenen Eigenschaften am unvorbehandelten sowie am Endotoxin- oder Endotoxoid-vorbehandelten Kaninchen sollen im Sinne dieser Hypothese dargestellt werden.

Zur Besprechung einzelner experimenteller Befunde wird im folgenden eine Übersicht über die Resultate gegeben.

1. Toxizität

Die Ergebnisse bestätigen vorangegangene Studien von Schmidt (1970). Nach intensiver Hydroxylamin-Einwirkung geht die Toxizität des Lipopolysaccharides für das Brutei verloren. Dabei erweist sich der Bruteitest erneut als ein empfindliches Nachweisverfahren für bakterielle Endotoxine (LD_{50} des E.coli O 26 : B 6 - LPS = $2,5 \times 10^{-2} \mu g$) (s. Abb. 15.A).

Die optimalen Inaktivierungsbedingungen liegen bei einem pH von 8,6 , einer Temperatur von 20 °C und einer Einwirkung von einmolarem Hydroxylamin (= Endkonzentration) über 5 Tage.

2. Pyrogenität am unvorbehandelten Kaninchen

Nicht nur die Toxizität, sondern auch die Pyrogenität am unvorbehandelten Kaninchen geht nach 5-tägiger Behandlung des Endotoxins mit Hydroxylamin unter den genannten Bedingungen größtenteils verloren (s. Abb.15.C). Etwa vom 3. Inkubationstag an kommt es zu einem signifikanten Verlust der fiebererregenden Wirkung.

Bei Diesen Untersuchungen fällt auf, daß Ansätze aus verschiedenen Chargen desselben kommerziellen Endotoxins durch Hydroxylamin einen unterschiedlich starken Aktivitätsverlust erleiden. Die resultierenden Temperatursteigerungen liegen zwischen völliger Apyrogenität und einem Temperaturmaximum von 0,6 °C. Nach Gabe von mit Hydroxylamin inaktiviertem Endotoxin kommt es regelmäßig zum Wegfall des zweiten Fiebergipfels.

3. Pyrogenität am vorbehandelten Kaninchen

Es kann davon ausgegangen werden, daß Endotoxin-vorbehandelte Kaninchen sowohl spezifische humorale Antikörper bilden als auch eine erhöhte RHS-Aktivität zeigen. Die erneute Zufuhr von bakteriellem Endotoxin wird daher anders beantwortet als beim unvorbehandelten Tier. In unseren Versuchen werden die Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit nativem Endotoxin bzw. mit Endotoxin vorbehandelt, das 5 Tage mit 1-molarem Hydroxylamin inkubiert worden ist.

Es ist ersichtlich, daß zwischen den beiden Präparationen hinsichtlich ihrer Toleranz-induzierenden Wirkung keine deutlichen Unterschiede bestehen. Der erste Fiebergipfel bleibt erhalten, während der zweite Fieberanstieg ausbleibt. Es kann aus dem gleichartigen Verhalten geschlossen werden, daß auch eine intensive Hydroxylamin-

Einwirkung auf das bakterielle Endotoxin ohne Einfluß auf dessen Fiebertoleranz-induzierende Aktivität bleibt (s. Abb. 15.C).

Auffällig ist, daß von 10 mit Endotoxoid vorbehandelten Tieren 4 Tiere mit ungewöhnlich starkem Fieber auf Endotoxin-Applikation reagieren. Möglicherweise vermag das Endotoxoidmolekül die Tiere stärker zu sensibilisieren als das native Endotoxin. Die humoralen Antikörpertiter (gemessen im passiven Haemagglutinationstest) zeigen dabei keine Unterschiede (s. Abb. 8.C).

4. Zur Antigenität des nativen und NH_2OH -vorbehandelten Endotoxins

Es ist bekannt, daß natives, bakterielles Endotoxin auch bei Kaninchen humorale Antikörper der Gruppe 19 S zu bilden im Stande ist. In einer Versuchsreihe haben wir erwartungsgemäß gefunden, daß derartige Antikörper nur einen geringfügigen Einfluß auf die Endotoxinwirkung im Hühnerei ausüben (s. Abb. 15.D). Dieser Befund stimmt sinngemäß mit den Arbeiten anderer Autoren überein, nach denen Endotoxin-stimulierte Antikörper keine Toxin- und Pyrogen-neutralisierenden Wirkungen aufweisen. Demgegenüber wird diesen Immunglobulinen eine starke Opsoninwirkung zugeschrieben. Die Besonderheit dieses Versuches liegt darin, daß unsere Neutralisationsversuche in einem immunologisch weitgehend inerten Testsystem (dem Brutei vom Huhn) ausgeführt werden.

In einer anderen Versuchsreihe wird der Einfluß von Hydroxylamin auf die Antigenität des Endotoxins im passiven Haemagglutinationstest geprüft. Es kann nachgewiesen werden, daß eine intensive Hydroxylaminvorbehandlung nicht nur die eitoxische und pyrogene Wirkung des Endotoxins, sondern auch seine antigenen Eigenschaften reduziert (s. Abb. 10.A).

Es ist demnach eine zur Zeit noch offene Frage, ob sich das atoxische, in seiner Pyrogenität stark eingeschränkte Endotoxin (Endotoxoid) mit der verbliebenen Antigenität

(ca. 25%) zur Stimulierung eines allgemeinen Toleranzzustandes eignet. Hierzu stehen noch Schutzversuche an geeigneten Tiermodellen aus. Es muß sich zeigen, ob Tiere, die mit Endotoxoid (5-tägige Inkubation mit Hydroxylamin) vorbehandelt worden sind, gegenüber einer Infektion mit Enterobacteriaceen eine erhöhte Resistenz ausgebildet haben. Die Toleranzversuche lassen die Vermutung offen, daß diese Tiere, verglichen mit unvorbehandelten Kontrolltieren, einen signifikanten Infektionsschutz zeigen.

5. Auslösung des Schwartzman-Phänomens

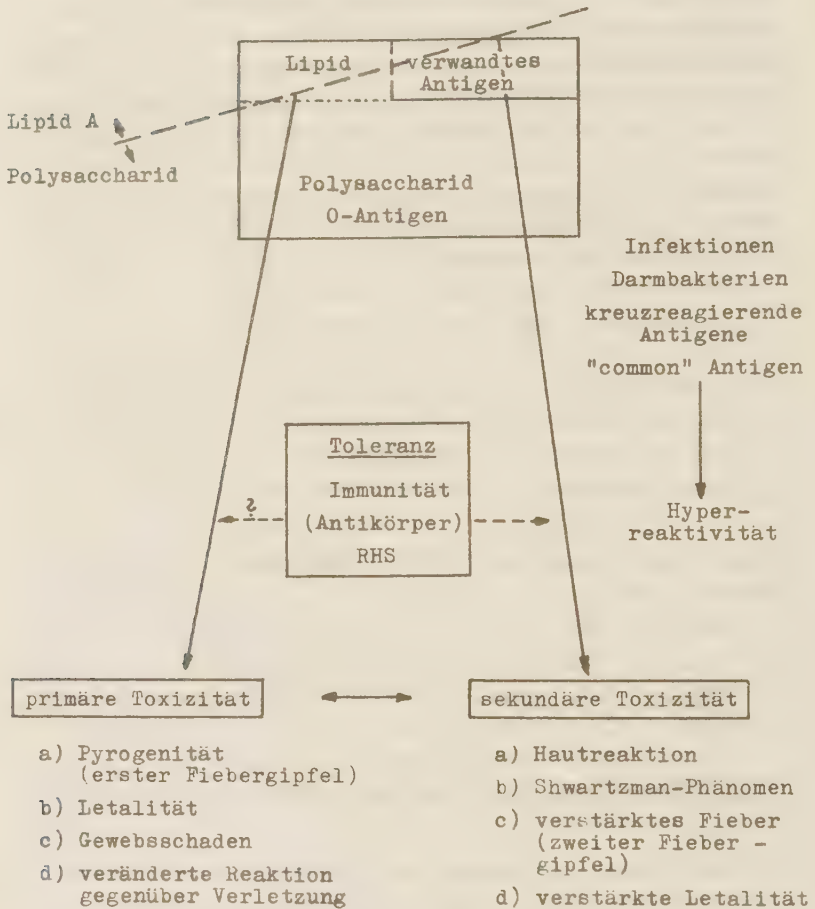
Zur Klärung, ob Hydroxylamin-vorbehandeltes Endotoxin noch das Schwartzman-Phänomen auslöst, werden unvorbehandelte bzw. mit nativem Endotoxin oder Endotoxoid (Inaktivierung mit Hydroxylamin über 1, 3 und 5 Tage) vorbehandelte Kaninchen verwendet. Zur intracutanen Einspritzung wird zunächst natives Endotoxin und (am selben Tier) 5 Tage mit Hydroxylamin behandeltes Endotoxin verwendet. Zur nachfolgenden intravenösen Injektion wird stets natives Endotoxin herangezogen.

Ein typisches Schwartzman-Phänomen mit Ausbildung einer Nekrose kann nur bei unvorbehandelten Tieren mit nativem Endotoxin ausgelöst werden (s. Tab. 5). Es fällt auf, daß nach einer Vorbehandlung der Tiere mit eintägig inaktiviertem LPS bereits die Nekrosebildung ausbleibt. Es bilden sich regelmäßig nur Erytheme aus. Ihr Durchmesser ist geringer als derjenige nach intracutaner Applikation von nativem Endotoxin bei unvorbehandelten Tieren.

Insgesamt zeigt sich auch aus diesen Versuchen, daß das Schwartzman-Phänomen offenbar durch zwei getrennte Vorgänge entsteht: erstens durch eine lokale, entzündliche Reaktion mit zelliger Infiltration der Injektionsstelle und zweitens durch eine haemorrhagische Nekrose auf dem Boden einer Thrombosierung der kleinen Gefäße dieses Gebietes (Lee und Stetson 1965, Schrader et al. 1964).

Die Hautreaktion wird mit Hypersensibilitätsphänomenen in Verbindung gebracht. Sie verschwindet erst ca. 10 Tage nach Beginn einer Endotoxinbehandlung (s. Tab. 5). Voraussetzung zu ihrer Auslösung ist die Anwesenheit von Antigen-Antikörper-Komplexen ("Trigger-Mechanismus" nach Stetson, 1961). Auch mit anderen Immunkomplexen läßt sich das Schwartzman-Phänomen auslösen. Endotoxoid ist augenscheinlich nicht in ausreichendem Maße fähig, die dafür notwendigen Antikörper zu bilden. Die haemorrhagische Reaktion ist unspezifisch, sie kann auch mit heterologen Endotoxin ausgelöst werden. Es ist anzunehmen, daß diese Reaktion in den vorbehandelten Tieren durch die Anwesenheit spezifischer Antikörper verhindert wird (Kováts und Végh 1967).

Abb. 14 : Mögliche Wirkungsmechanismen gramnegativer bakterieller Endotoxine
(nach Watson und Kim 1964, aus: Chedid und Parrant 1971)



Über den Einfluß von Hydroxylamin auf Endotoxin ist bisher wenig bekannt gewesen. Tauber (1961) fand, daß nach Hydroxylaminolysis ein wasserlösliches Produkt übrigbleibt, das so gut wie keine Fettbestandteile enthält und in seinem Stickstoff- und Phosphatgehalt gegenüber nativem Endotoxin nur leicht verändert ist. Durch Ultrazentrifugation trennt er zwei Komponenten, einen Anteil mit einem Molekulargewicht von ca. 200 000 und einen (oder mehrere) Anteile in der Größenordnung von 10 000. In wie weit die einzelnen Bruchstücke biologisch aktiv sind bzw. welche strukturellen Veränderungen sie erfahren haben, ist unbekannt.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es offenbar unterschiedliche Mechanismen der Endotoxinwirkung gibt.

Eine Haupteigenschaft ist die Anlagerung an Zellmembranen. Diese wird bereits durch eintägige Einwirkung von einmolarem Hydroxylamin zu einem großen Teil reduziert. Diese abrupt auftretende Veränderung wird nicht nur in den Versuchen mit Erythrozyten sichtbar, sondern zeigt sich auch in Toxizitätsprüfungen am Brutei. Man kann annehmen, daß es in diesem immunologisch weitgehend inerten System fast ausschließlich zu direkten endotoxischen Reaktionen kommt.

Demgegenüber sind der Rückgang der Pyrogenität (Reduktion des ersten und Abflachung des zweiten Gipfels) wie auch der Antikörper-stimulierenden Wirkung nach Hydroxylamineinwirkung eher allmähliche Prozesse. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um verschiedene reagierende Molekülbereiche.

Die Reaktionen von biologisch und immunologisch reiferen Organismen auf Endotoxin sind nicht streng in primär und sekundär toxisch zu unterteilen, da Endotoxin hier einen systemischen Effekt auslöst, bei dem die individuelle Reaktionslage und der aktuelle Immunstatus des Makroorganismus entscheidende Rollen spielen.

Ob die künstliche Detoxifizierung bakteriellen Endotoxins durch Hydroxylamin natürliche Entgiftungs- und Abbaumechanismen nachahmt, ist ungewiß. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß es auch natürlicherweise bei der Wechselwirkung von Endotoxin mit Granulozyten zu einer Reduktion des Gehaltes an langkettigen Carboxylsäuren kommt (s. Gimber und Rafter 1969).

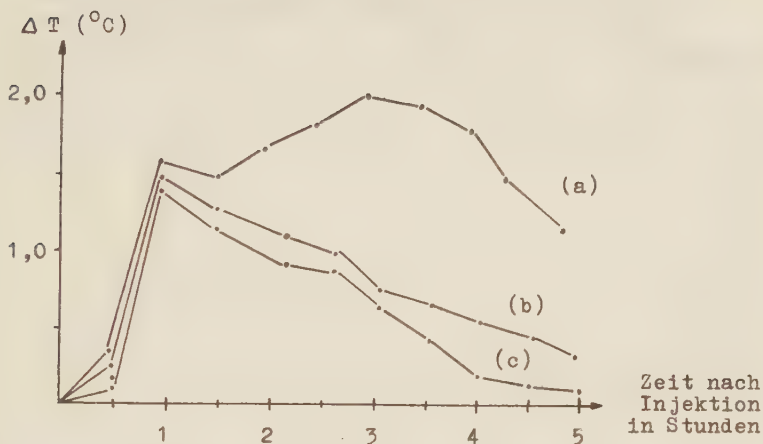
D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß von Hydroxylamin auf die toxische, pyrogene, Fiebertoleranz-induzierende und antigene Wirkung von E.coli O 26 : B 6 - Endotoxin untersucht. Im alkalischen Milieu (pH 8,6) vermag Hydroxylamin in einer Endkonzentration von 1 Mol/l über einen Einwirkungszeitraum von einem bis zu fünf Tagen die gesamten biologischen Eigenschaften des bakteriellen Lipopolysaccharides unterschiedlich stark zu beeinflussen. In verschiedenen, empfindlichen Testsystemen werden die toxischen, pyrogenen, Fiebertoleranz-induzierenden und antigenen Wirkungen von nativem Endotoxin und mit Hydroxylamin vorbehandeltem Endotoxin vergleichend untersucht.

Es ergeben sich folgende Befunde:

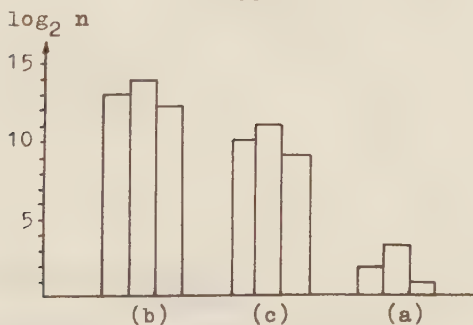
1. Toxizitätsstudien am Brutei (i.v.-Injektionstechnik) zeigen, daß Endotoxin nach fünftägiger Inkubation mit Hydroxylamin seine Toxizität nahezu vollständig verloren hat.
2. Fiebermessungen am unvorbehandelten Kaninchen ergeben, daß die pyrogene Endotoxin-Wirkung nach fünftägiger Einwirkung des einmolaren Hydroxylamin zerstört ist. Nach geringeren Einwirkungszeiten des Hydroxylamins kommt es noch zu Fieberreaktionen; jedoch zeigt sich eine deutliche Reduktion des ersten Fiebergipfels und eine starke Abflachung des zweiten Gipfels.
3. Temperaturmessungen an vorbehandelten Kaninchen führen zu dem Ergebnis, daß Endotoxoid-vorbehandelte Tiere noch im Stande sind, gegenüber nativem Endotoxin eine typische inkomplette Pyrogentoleranz zu entwickeln.
4. Unter Verwendung des passiven Haemagglutinationstests kann gezeigt werden, daß das resultierende Endotoxoid trotz intensiver Hydroxylamin-Behandlung noch geringe antigene Eigenschaften aufweist.

Teilabb. 15.C : Temperaturmessungen an vorbehandelten Kaninchen



Bemerkungen: (a) unvorbehandelte Kontrolltiere
 (b) mit Endotoxin vorbehandelte Kaninchen
 (c) mit NH₂OH-inaktiviertem Endotoxin vorbehandelte Kaninchen

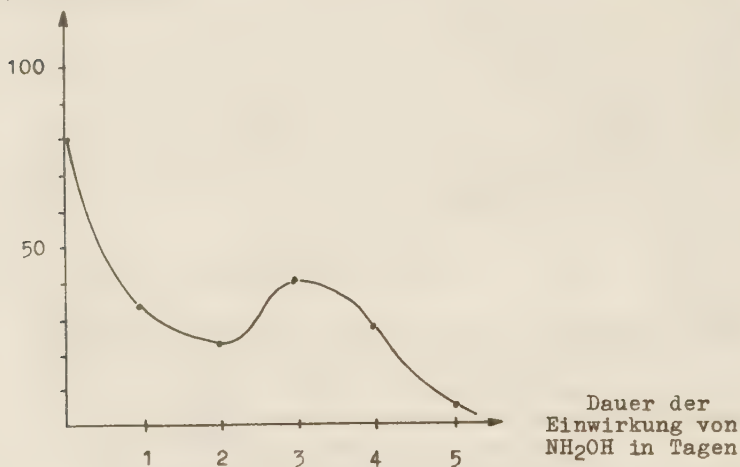
Teilabb. 15.D : Antikörperbestimmung mittels passiver Haemagglutination (HA)



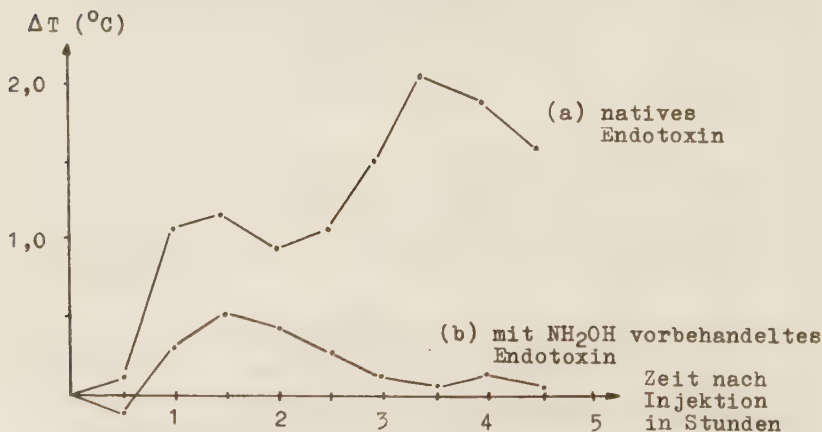
Bemerkungen: (a) unvorbehandelte Kaninchen
 (b) mit Endotoxin vorbehandelte Kaninchen
 (c) mit NH₂OH-inaktiviertem Endotoxin vorbehandelte Kaninchen

Abb. 15 : Überblick über die Untersuchungen zur Toxizität, Pyrogenität, Antigenität und Fiebertoleranz-induzierenden Wirkung eines mit NH_2OH vorbehandelten bakteriellen Lipopolysaccharides

% Mortalität



Teilabb. 15.A : Toxizitätsmessungen am Brutei (i.v.-Technik)



Teilabb. 15.B : Temperaturmessungen an unvorbehandelten Kaninchen

Es wird versucht, diese Ergebnisse im Rahmen der Hypothese über die Endotoxin-Wirkung zu erklären. Durch Hydroxylaminbehandlung ist ein Endotoxin-Derivat entstanden, das bei stark reduzierter Toxizität, Pyrogenität und Antigenität seine Fähigkeit zur Toleranzentwicklung behalten hat. In wie weit es sich zur klinischen Anwendung als Endotoxoid eignet, muß noch an anderen Versuchsmodellen unter Infektionsbelastung abgeklärt werden.

E. S C H R I F T T U M V E R Z E I C H N I S

1. Arend, P., G.F. Springer
Mechanismus und Spezifität der Endotoxin-
bindung an Zellmembranen
Arzneim.-Forsch. 21 (1971), 1506
2. Atkins, E.
Pathogenesis of Fever
Physiol.Rev. 40 (1960), 580
3. Atkins, E., C. Heijn jr.
Studies on Tuberculin Fever
III. Mechanism Involved in the Release of
Endogenous Pyrogen in vitro
J.Exp.Med. 122 (1965), 207
4. Atkins, E., E.S. Snell
Fever
in: Zweifach, B.W., L. Grant, R.T. McCluskey (ed.)
The Inflammatory Process, Academic Press
New York / London 1965, 495
5. Baker, P.J., J.B. Wilson
Hypoferremia in Mice and Its Application to
the Bioassay of Endotoxin
J.Bacteriol. 90 (1965), 903
6. Berger, F.M., G.M. Fukui
Endotoxin Induced Resistance to Infections
and Tolerance
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 114 (1963), 780
7. Besredka, A.
Die lokale Immunisierung
Leipzig 1926
8. Bizio, G., B. Benacerraf, B.N. Halpern
The Effect of Salmonella typhi and Its
Endotoxin on the Phagocytic Activity of the
Reticuloendothelial System in Mice
Brit.J.Exp.Path. 36 (1955), 226
9. Bozicevich, J., J.P. Nasou, D.E. Kayhoe
Deoxyribonucleic Acid (DNA) - Bentonite -
Flocculation Test for L.Erythematodes
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 103 (1960), 636

10. Brown, K.R., H. Douglas, A.I. Braude
Prevention of Death from Endotoxin with
Antisera: II. Elimination of the Risk of
Anaphylaxis to Endotoxin
J. Immunol. 106 (1971), 324
11. Chedid, L., M. Parant
Role of Hypersensitivity and Tolerance in
Reactions to Endotoxins
in: Kadis, S., G. Weinbaum, S.J. Ajl (ed.)
Microbial Toxins. A Comprehensive Treatise
Volume V: Bacterial Endotoxins
Academic Press New York / London 1971, 415
12. Cline, M.J., K.L. Melmon, W.C. Davis, H.E. Williams
Mechanism of Endotoxin Interaction with
Human Leucocytes
Brit. J. Haematol. 15 (1968), 539
13. Cooper, J.F., J. Levin, H.N. Wagner jr.
Quantitative Comparison of in vitro and in
vivo Methods for the Detection of Endotoxin
J. Lab. Clin. Med. 78 (1971), 138
14. Davis, C.E., K.R. Brown, H. Douglas, W.J. Tate, A.I. Braude
Prevention of Death from Endotoxin with
Antisera: I. The Risk of Fatal Anaphylaxis
to Endotoxin
J. Immunol. 102 (1969), 563
15. Deutsches Arzneibuch 7. Ausg.
Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH
Frankfurt a.M.: Covi Verlag, 7. Ausg. 1968
16. Eichenberger, E.
Fieber und endogene Hyperthermie durch
pharmakologische, immunologische und physi-
kalische Maßnahmen
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Band XVI, Teil 15, Springer Verlag Heidelberg /
New York 1966, 215

17. Feldberg, W., P.N. Saxena
Mechanism of Action of Pyrogen
J. Physiol. 211 (1970), 245
18. Galanos, C., O. Lüderitz, O. Westphal
Preparation and Properties of Antisera
against the Lipid-A Component of Bacterial
Lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. 24 (1971), 116
19. Gillman, S.M., D.L. Bornstein, W.B. Wood jr.
Studies on the Pathogenesis of Fever
VIII. Further Observations on the Role of
Endogenous Pyrogen in Endotoxin Fever
J. Exp. Med. 114 (1961), 729
20. Gimber, P.E., G.W. Rafter
The Interaction of Escherichia coli Endo-
toxin with Leukocytes
Arch. Biochem. Biophys. 135 (1969), 14
21. Greisman, S.E., F.A. Carozza jr., J.D. Hills
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
I. Relationship between Tolerance and
Reticuloendothelial System Phagocytic
Activity in the Rabbit
J. Exp. Med. 117 (1963), 663
22. Greisman, S.E., H.N. Wagner jr., M. Ilio, R.B. Hornick
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
II. Relationship between Endotoxin Tolerance
and Reticuloendothelial Phagocytic Activity
in Man
J. Exp. Med. 119 (1964), 241
23. Greisman, S.E., W.E. Woodward
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
III. The Refractory State During Continuous
Intravenous Infusions of Endotoxin
J. Exp. Med. 121 (1965), 911

24. Greisman, S.E., E.J. Young, W.E. Woodward
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
IV. Specificity of the Pyrogenic Refractory
State during Continuous Intravenous Infusions
of Endotoxin
J.Exp.Med. 124 (1966), 983
25. Greisman, S.E., E.J. Young, F.A. Carozza jr.
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
V. Specificity of the Early and Late Phase
of Pyrogenic Tolerance
J.Immunol. 103 (1969), 1223
26. Greisman, S.E., E.J. Young
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
VI. Transfer of the "Anamnestic" Tolerant
Response with Primed Spleen Cells
J.Immunol. 103 (1969), 1237
27. Greisman, S.E., C.L. Woodward
Mechanisms of Endotoxin Tolerance
VII. The Role of the Liver
J.Immunol. 105 (1970), 1468
28. Großgebauer, K.
Virusbedingtes Fieber (Ergebnisse und
Probleme)
Klin.Wschr. 45 (1967), 749
29. Großgebauer, K., H. Langmaack
Eine Verbesserung der intravenösen Injektions-
technik beim embryonierten Hühnerei
Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 153 (1967), 225
30. Hahn, F., A. Lange
Das Anaphylatoxin. Eine alte Theorie der
Anaphylaxie in neuer Sicht
Dtsch.Med.Wschr. 81 (1956), 1269
31. Haskins, W.T., M. Landy, K.C. Milner, E. Ribi
Biological Properties of Parent Endotoxins
and Lipoid Fractions, with a Kinetic Study
of Acid-Hydrolyzed Endotoxin
J.Exp.Med. 114 (1961), 765

32. Haugen, J.

The Formation of Antibodies to Endotoxin in
Warfarin-Treated Rabbits

Acta path.microbiol.scand.Section B 79 (1971), 219

33. Heilman, D.H.

The Selective Toxicity of Endotoxin for
Phagocytic Cells of the Reticuloendothelial
System

Int.Arch.Allergy 26 (1965), 63

34. Heilman, D.H.

In vitro Toxicity of Endotoxin for Macro-
phages of Young Guinea Pigs and Rabbits

Int.Arch.Allergy 33 (1968), 501

35. Herion, J.C., R.I.Walker, J.G.Palmer

Endotoxin Fever in Granulocytopenic Animals

J.Exp.Med. 113 (1961), 1115

36. Herion, J.C., W.B.Herring, R.I.Walker, J.G.Palmer

Abolition of Endotoxin Tolerance: Effect on
Circulating Leukocytes

Am.J.Physiol. 215 (1968), 811

37. Hinshaw, L.B.

Release of Vasoactive Agents and the Vascular
Effects of Endotoxin

in: Kadis, S., G.Weinbaum, S.J.Ajl (ed.)

Microbial Toxins. A Comprehensive Treatise

Volume V: Bacterial Endotoxins

Academic Press New York / London 1971, 209

38. Johnson, A.G., A.Nowotny

Relationship of Structure to Function in
Bacterial O Antigens

III. Biological Properties of Endotoxoids

J.Bacteriol. 87 (1964), 809

39. Kataoka, T., K.Inoue, C.Galanos, S.C.Kinsky

Detection and Specificity of Lipid A Anti-
bodies Using Liposomes Sensitized with

Lipid A and Bacterial Lipopolysaccharides

Eur.J.Biochem. 24 (1971), 123

40. Kessel, R.W.I., W.Praun
Cytotoxicity of Endotoxin in vitro. Effects
on Macrophages of Normal Guinea Pigs
Austr.J.Exp.Biol.Med.Sci. 43 (1965), 511
41. Kessel, R.W.I., W.Braun, O.J.Plescia
Endotoxin Cytotoxicity: Role of Cell-
Associated Antibody
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 121 (1966) 449
42. Kétyi, I.
Endotoxin-Wertmessung in Hühnerembryonen
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 192 (1964), 373
43. Kim, Y.B., D.W.Watson
Modification of Host Responses to Bacterial
Endotoxins. II. Passive Transfer of Immunity
to Bacterial Endotoxin with Fractions
Containing 19 S Antibodies
J.Exp.Med. 121 (1965), 751
44. Kováts, T.G., P.Végh
Shwartzman Reaction in Endotoxin-Resistant
Rabbits Induced by Heterologous Endotoxin
Immunol. 12 (1967), 445
45. Lasch, H.G.
Pathophysiologie des Endotoxinschocks
Med.Welt 31 (1967), 1780
46. Lee, L., C.A.Stetson jr.
Studies on the Mechanism of the Shwartzman
Phenomenon. Accelerated Cutaneous Reactivity
to Bacterial Endotoxins
J.Exp.Med. 111 (1960), 761
47. Lee, L., C.A.Stetson jr.
The Local and Generalized Shwartzman
Phenomenon
in: Zweifach, B.W., L.Grant, R.T.McCluskey (ed.)
The Inflammatory Process, Academic Press
New York / London 1965, 791

48. Levin, J., T.E. Poore, N.P. Zauber, R.S. Oser
Detection of Endotoxin in the Blood of
Patients with Sepsis due to Gram-negative
Bacteria
New Engl. J. Med. 283 (1970), 1313
49. Michael, J.G., W. Braun
Modification of Bactericidal Effects of
Human Sera
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 102 (1959), 486
50. Michael, J.G.
The Release of Specific Bactericidal
Antibodies by Endotoxin
J. Exp. Med. 123 (1966), 205
51. Milner, K.C., R.A. Finkelstein
Bioassay of Endotoxin: Correlation between
Pyrogenicity for Rabbits and Lethality for
Chick Embryos
J. Infect. Diseases 116 (1966), 529
52. Mizuno, D., O. Yoshioka, M. Akamatu, T. Kataoka
Antitumor Effect of Intracutaneous Injection
of Bacterial Lipopolysaccharide
Canc. Res. 28 (1968), 1531
53. Mulholland, J.H., S.M. Wolff, A.L. Jackson, M. Landy
Quantitative Studies of Febrile Tolerance
and Levels of Specific Antibodies Evoked
by Bacterial Endotoxin
J. Clin. Invest. 44 (1965), 920
54. Nagler, A.L., S.M. Levenson
Experimental Hemorrhagic and Endotoxic Shock
in: Kadis, S., G. Weinbaum, S.J. Ajl (ed.)
Microbial Toxins. A Comprehensive Treatise
Volume V: Bacterial Endotoxins
Academic Press New York / London 1971, 341
55. Neter, E.
Bacterial Hemagglutination and Hemolysis
Bact. Rev. 20 (1956), 166

56. Neter, E.
Endotoxins and the Immune Response
Curr.Top.Microbiol.and Immunol. 47 (1969), 82
57. Netzer, W., W.Vogt
Anaphylatoxinbildung durch pyrogenes Lipopolysaccharid
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.u.Pharmak.
248 (1964), 261
58. Noble, R.E., D.Koch-Weser
In vitro Inhibition of Leukocyte Uptake of
Radioactive Endotoxin by Components of
Normal Serum
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 121 (1966), 541
59. Nowotny, A.
Immunogenicity of Toxic and Detoxified
Endotoxin Preparations
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 127 (1968), 745
60. Nowotny, A.
Molecular Aspects of Endotoxic Reactions
Bact.Rev. 33 (1969), 72
61. Nowotny, A.
Relationship of Structure and Biological
Activity of Bacterial Endotoxins
Naturwissenschaften 58 (1971), 397
62. Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
1.Mittlg.: Der Grundversuch zur Schutz-
impfung der Maus gegen eine Enteritis-
Infektion
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 193 (1964), 398
63. Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
2.Mittlg.: Experimente zur unspezifischen
Schutzwirkung bei der Enteritis-Infektion
der Maus
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 197 (1965), 368

64. Ralovich, B., C. Láng
Antipyrogenic Effect of Immune Sera
Z.Immun-Forsch. 141 (1971), 251
65. Ribi, E., W.T.Haskins, M.Landy, K.C.Milner
Symposium on Bacterial Endotoxins
I. Relationship of Chemical Composition to
Biological Activity
Bact.Rev. 25 (1961), 427
66. Ribi, E., W.T.Haskins, M.Landy, K.C.Milner
Preparation and Host-Reactive Properties
of Endotoxin with Low Content of Nitrogen
and Lipid
J.Exp.Med. 114 (1961), 747
67. Rietschel, E.T., C.Galanos, A.Tanaka, E.Ruschmann
O.Lüderitz, O.Westphal
Biological Activities of Chemically Modified
Endotoxins
Eur.J.Biochem. 22 (1971), 218
68. Rudbach, J.A.
Molecular Immunogenicity of Bacterial Lipopolysaccharide Antigens: Establishing a
Quantitative System
J.Immunol. 106 (1971), 993
69. Schmidt, H.
Die intravenöse Injektionstechnik am Brutei
zum Nachweis von nativen und vorbehandelten
bakteriellen Endotoxinen
Inaugural-Dissertation, ehem.Med.Fak. Freie Universität Berlin, 12.11.1970
70. Schmidt, H., K.Großgebauer, H.Langmaack
Die detoxifizierende Wirkung von Hydroxylamin auf bakterielle Lipopolysaccharide
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 218 (1971), 105
71. Schrader, W.H., B.F.Woolfrey, R.D.Brunning
Studies with Tritiated Endotoxin
III. The Local Shwartzman Reaction
Am.J.Pathol. 44 (1964), 597

72. Skarnes, R.C.

The Inactivation of Endotoxin after Interaction with Certain Proteins of Normal Serum
Ann.N.Y.Acad.Sci. 133 (1966), 644

73. Snell, E.S., E. Atkins

Interactions of Gram-negative Bacterial Endotoxin with Rabbit Blood in vitro
Am.J.Physiol. 212 (1967), 1103

74. Snell, E.S.

Endotoxin and the Pathogenesis of Fever
in: Kadis, S., G. Weinbaum, S.J. Ajl (ed.)
Microbial Toxins. A Comprehensive Treatise
Volume V: Bacterial Endotoxins
Academic Press New York / London 1971, 277

75. Springer, G.F.

Role of Human Cell Surface Structures in Interactions between Man and Microbes
Naturwissenschaften 57 (1970), 162

76. Stetson, C.A. jr.

Symposium on Bacterial Endotoxins
IV. Immunological Aspects of the Host Reaction to Endotoxins
Bact.Rev. 25 (1961), 457

77. Stinebring, W.R., J.S. Younger

Patterns of Interferon Appearance in Mice Injected with Bacteria of Bacterial Endotoxin
Nature 204 (1964), 712

78. Sultz, B.M.

Chemical Modification of Endotoxin and Inactivation of Its Biological Properties
in: Kadis, S., G. Weinbaum, S.J. Ajl (ed.)
Microbial Toxins, A Comprehensive Treatise
Volume V: Bacterial Endotoxins
Academic Press New York / London 1971, 91

79. Suzuki, T., H.Y. Whang, E.A. Gorzynski, E. Neter
Inhibition by Lipopolysaccharide (Endotoxin)
of Antibody Response of Rabbit to Common
Antigen of Enterobacteriaceae
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 117 (1964), 785
80. Tauber, H., H. Russel, W.J. Guest
Nature of Polysaccharide Obtained from
Endotoxins by hydroxylaminolysis
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 107 (1961), 964
81. Wardlaw, A.C.
Possible Reasons for the Inefficiency of
Gram-Negative Bacterial Vaccines
Progr.immunobiol.Standard., vol.5, 508
(Karger, Basel 1972)
82. Watson, D.W., Y.B. Kim
Modification of Host Responses to Bacterial
Endotoxins. I. Specificity of Pyrogenic
Tolerance and the Role of Hypersensitivity
in Pyrogenicity, Lethality and Skin
Reactivity
J.Exp.Med. 118 (1963), 425
83. Westphal, O., O. Lüderitz
Chemische Erforschung von Lipopolysaccha-
riden gramnegativer Bakterien
Angew.Chem. 66 (1954), 407
84. Westphal, O., A. Nowotny, O. Lüderitz, H. Hurin
E. Eichenberger, G. Schönholzer
Die Bedeutung der Lipoid-Komponente
(Lipoid A) für die biologischen Wirkungen
bakterieller Endotoxine (Lipopolysaccharide)
Pharm.Acta Helv. 33 (1958), 401
85. Wolff, S.M., J.H. Mulholland, M. Rubenstein, P.D. Mott
Effect of 6-Mercapto-Purine on Endotoxin
Tolerance
Clin.Res. 12 (1964), 455

86. Wolff, S.M., S.B. Ward, M. Landy
Serologic Properties of Bentonite Particles
Coated with Microbial Polysaccharides
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 114 (1965), 530
87. Wood, W.B. Jr.
Role of Endogenous Pyrogen in the Genesis
of Fever
Lancet 2 (1958), 53

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr.med.K.Großgebauer für die Überlassung des Themas und für die großzügige bereitstellung des benötigten Materials. Darüberhinaus bedanke ich mich für die wertvolle Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Experimente und der Diskussion der Ergebnisse.

Weiterhin gilt mein Dank allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben; meine besondere Anerkennung gebührt Frau Ursula Theil für ihre Hilfe bei der praktischen Ausführung der Experimente.

Lebenslauf

Am 18.August 1947 wurde ich als Tochter des Diplom-Ingenieurs Ferdinand Klingebiel und seiner Frau Hildegard geb. Lau in Berlin geboren. Am 1.April 1954 wurde ich in die 21.Grundschule in Berlin-Kreuzberg eingeschult. Ich kam am 1.April 1960 auf die Robert-Koch-Oberschule, die ich Ostern 1967 nach Ablegen der Reifeprüfung verließ.

Am 30.Mai 1967 wurde ich an der ehemaligen Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert, wo ich am 4.April 1968 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 7.Oktober 1969 die ärztliche Vorprüfung bestanden habe. Mein gesamtes Studium habe ich in Berlin absolviert. Am 27.Februar 1973 habe ich das Staatsexamen bestanden.

